

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Wnt-Signalweg in der Makrophagen-induzierten Invasion von
Brustkrebszellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Florian Klemm

aus
Mittweida

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

Berichterstatterin : Prof. Dr. med. C. Binder

Berichterstatter/in : Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wodarz

Berichterstatter/in : Prof. Dr. rer. nat. Patricia Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	11
1.1	Die Anfänge und Wurzeln des Wnt-Signalwegs	11
1.2	Der Kanonische Wnt-Signalweg	11
1.3	Die Nichtkanonischen Wnt-Signalwege	14
1.3.1.1	Planar-Cell-Polarity-Signalweg	15
1.3.1.2	Wnt/Ca ²⁺ -Signalweg.....	16
1.4	Die Wnt-Signalwege in der Genese und Progression des Mamma-Karzinoms	17
1.5	Die Bedeutung und Zusammensetzung des Tumor-Mikroenvironments	19
1.5.1	Die Tumor-assoziierten Makrophagen im Mammakarzinom	21
1.5.2	Das Tumor-Mikroenvironment und Wnt-Signaling.....	22
1.6	Zielsetzung der Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Zelllinien.....	23
2.1.2	Bakterienstamm	23
2.1.3	Chemikalien, Medien und Puffer.....	23
2.1.3.1	Chemikalien.....	23
2.1.3.2	Zellkulturmedien und Lösungen	24
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.5	Geräte	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	26
2.2.2	Zellzahlbestimmung	26
2.2.3	Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut.....	26
2.2.4	Ko-Kulturversuche	27
2.2.4.1	Vorbemerkung.....	27
2.2.4.2	Analytische Ko-Kulturversuche	28
2.2.4.3	In-vitro-Mikroinvasionsassay.....	28
2.2.5	RNA-Extraktion	29
2.2.5.1	Vorbemerkung.....	29
2.2.5.2	Reagenzien	29

2.2.5.3	RNA-Extraktion nach der Guanidinium-Thiocyanat-Methode.....	30
2.2.5.4	RNA-Extraktion mittels RNeasy-Kit.....	30
2.2.5.5	Spektrometrische Nukleinsäuren-Konzentrationsmessung.....	31
2.2.6	Reverse Transkription.....	31
2.2.6.1	Vorbemerkung.....	31
2.2.6.2	Materialien.....	31
2.2.6.3	Reagenzien.....	32
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.2.7.1	Vorbemerkung.....	32
2.2.7.2	β -Aktin-PCR.....	32
2.2.7.3	Qualitative PCR für Mitglieder des Wnt-Signalwegs.....	33
2.2.8	Agarosegel-Elektrophorese.....	34
2.2.8.1	Reagenzien.....	34
2.2.8.2	Durchführung.....	34
2.2.9	cDNA-Arrays.....	36
2.2.9.1	Vorbemerkung.....	36
2.2.9.2	Reagenzien.....	37
2.2.9.3	RNA-Isolation.....	38
2.2.9.4	Herstellung der markierten cDNA.....	38
2.2.9.5	Hybridisierung.....	39
2.2.9.6	Chemolumineszenzdetektion.....	39
2.2.10	Plasmid-Herstellung und Transfektion.....	39
2.2.10.1	Reagenzien.....	39
2.2.10.2	Bakterienkultur.....	40
2.2.10.3	Transformation.....	40
2.2.10.4	Plasmidpräparation.....	40
2.2.10.5	Transiente Transfektion.....	41
2.2.11	Luciferase-Reporter-Assays.....	42
2.2.12	Proteinextraktion.....	43
2.2.12.1	Reagenzien.....	43
2.2.12.2	Zellyse und Homogenisation.....	43
2.2.12.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
2.2.13	Immunoblot.....	44
2.2.13.1	Vorbemerkung.....	44
2.2.13.2	Reagenzien.....	44
2.2.13.3	Diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese.....	45
2.2.13.4	Proteintransfer.....	45
2.2.13.5	Immunfärbung.....	46
2.2.14	Immunfluoreszenzfärbung.....	47
2.2.14.1	Vorbemerkung.....	47
2.2.14.2	Reagenzien.....	47
2.2.14.3	Durchführung.....	47
2.2.14.4	Mikroskopie.....	48

2.2.15	MTT-Test	48
2.2.15.1	Reagenzien	48
2.2.15.2	Durchführung.....	49
2.2.16	Zymographie	49
2.2.16.1	Vorbemerkung.....	49
2.2.16.2	Reagenzien	49
2.2.16.3	Durchführung.....	50
2.2.17	Statistische Auswertung	51
3	ERGEBNISSE.....	52
3.1	Expressionsanalyse mittels RT-PCR und cDNA-Arrays	52
3.1.1	Nachweis vermehrter Wnt-5a-mRNA-Expression in Makrophagen nach Ko-Kultur mittels RT-PCR	52
3.1.2	Identifizierung weiterer Wnt-Komponenten mittels cDNA Arrays	52
3.2	In-vitro-Invasionsversuche	56
3.2.1	Dkk1 inhibiert die Makrophagen-induzierte Invasivität	56
3.2.2	Wnt-5a stimuliert die Invasivität von Tumorzellen	58
3.2.3	In-vitro-Invasionsversuche transfizierter Tumorzellen.....	58
3.3	MTT-Assay	60
3.3.1	Dkk1 bewirkt im MTT-Test keine Abnahme der Viabilität.....	61
3.4	Immunoblots	61
3.4.1	Fehlende Regulation von β -Catenin und E-Cadherin in der Ko-Kultur.....	61
3.4.2	Wnt-5a führt in MCF-7 zu keiner Aktivierung der PKC	62
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen	63
3.5.1	Keine Veränderung der zellulären Lokalisation β -Catenins in MCF-7-Zellen in der Ko- Kultur	63
3.5.2	Wnt-5a-Proteinexpression wird in Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7 hochreguliert.....	64
3.6	Reporterassays	65
3.6.1	Wnt-5a beeinflusst in MCF-7-Zellen nicht den kanonischen Wnt-Signalweg.....	65
3.7	Zymographie	66
3.7.1	MMP-2 und MMP-9 werden durch Dkk1 nicht reguliert.....	66
3.7.2	MMP-7 wird durch Dkk1 reguliert	67
4	DISKUSSION	68
4.1	Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität durch den Wnt-Inhibitor Dkk1	68

4.2	Fehlende Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch Ko-Kulturbedingungen	69
4.3	Wnt-5a als Mediator der Makrophagen-induzierten Invasivität	70
4.4	Analyse weiterer involvierter Wnt-Signalwege	72
4.5	Wnt-abhängige Regulation pro-invasiver Faktoren	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	kanonischer Wnt-Signalweg	12
Abbildung 1.2:	Überblick der verschiedenen Wnt-Signalwege	15
Abbildung 2.1:	modifizierte Boyden-Kammer für in-vitro-Invasionsversuche	28
Abbildung 2.2:	Prinzip des cDNA-GEArray	37
Abbildung 3.1:	Wnt-5a-Expression in Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7	52
Abbildung 3.2:	GEArray von Makrophagen in Einzelkultur	54
Abbildung 3.3:	GEArray von Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7	54
Abbildung 3.4:	GEArray von MCF-7 in Einzelkultur	55
Abbildung 3.5:	GEArray von MCF-7 in Ko-Kultur mit Makrophagen	55
Abbildung 3.6:	in-vitro-Invasionsassay von MCF-7 in Ko-Kultur mit M ϕ unter Dkk1	57
Abbildung 3.7:	DAPI-Färbung invadierter MCF-7 unter Dkk1	57
Abbildung 3.8:	in-vitro-Invasionsassay von MCF-7 unter Wnt-5a	59
Abbildung 3.9:	DAPI-Färbung invadierter MCF-7 unter Wnt-5a	59
Abbildung 3.10:	in-vitro-Invasionsassay von mit LEF-Konstrukten transient transfizierter MCF-7-Zellen	60
Abbildung 3.11:	Immunoblot gegen β -Catenin, E-Cadherin in MCF-7 unter Ko-Kultur und Dkk1	62
Abbildung 3.12:	Immunoblot gegen PKC (gesamt, phosphoryliert) in MCF-7 unter Wnt-5a	63
Abbildung 3.13:	Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Catenin von MCF-7 in Ko-Kultur	64
Abbildung 3.14:	Immunfluoreszenzfärbung gegen Wnt-5a von M ϕ in Ko-Kultur mit MCF-7	64
Abbildung 3.15:	SuperTOP-Reporter-Assay von MCF-7-Zellen unter Wnt-5a	66
Abbildung 3.16:	MMP-2- und MMP-9-Zymographie von MCF-7 in Ko-Kultur und Dkk1	67
Abbildung 3.17:	MMP-3- und MMP-7-Zymographie von MCF-7 in Ko-Kultur und Dkk1	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	PCR-Konditionen	33
Tabelle 2.2:	Sequenzen und Amplifikatlänge (in bp) der verwendeten Primer	35
Tabelle 3.1:	mRNA-Expression von Wnt-Liganden, Rezeptoren, Inhibitoren und Zielgenen des Signalweges in der RT-PCR	53
Tabelle 3.2:	mRNA-Expression von Liganden, Rezeptoren, Inhibitoren und Zielgenen des Wnt-Signalweges im GEArray	53
Tabelle 3.3:	in-vitro-Invasionsassay von MCF-7-Zellen in Ko-Kultur mit M ϕ unter Dkk1	57
Tabelle 3.4:	in-vitro-Invasionsassay von MCF-7 unter Wnt-5a	58
Tabelle 3.5:	in-vitro-Invasionsassay von mit LEF-Konstrukten transfizierter MCF-7-Zellen	60
Tabelle 3.6:	MTT-Assay von MCF-7 und M ϕ unter Dkk1	61
Tabelle 3.7:	SuperFOP-Aktivität in MCF-7 unter Wnt-5a	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
APC	adenomatosis Polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-9-2	<i>B-cell-lymphoma-9-2</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CamKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CBP	<i>Creb binding protein</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c-jun	jun Onkogen
CKI α	Casein-Kinase I α
CMV	Zytomegalievirus
CtBP	<i>C terminal binding protein</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIX	Dishevelled-Axin-Domäne
Dkk	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfidoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>

Abkürzung	Definition
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
Dvl	<i>Dishevelled</i>
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz, <i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epithelial growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor, <i>epithelial growth factor receptor</i>
FCS	Fötale Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fz	<i>Frizzled</i>
g	Gramm
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
GTC	Guanidin-thiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung, <i>HEPES buffered saline</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	<i>high mobility group</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
IDV	<i>integrated density value</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-jun-N-terminale-Kinase
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>

Abkürzung	Definition
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>low density lipoprotein receptor related protein</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
ME	β-Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia Virus</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MOPS	3-[N-Morpholino-]Propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mφ	Makrophage
MW	Molekulargewicht
NFAT	<i>nuclear factor of T cells</i>
NK	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Planare Zellpolarität, <i>planar cell polarity</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
ROK	Rho-assoziierte-Kinase
RPA	Ribonuklease-Protektions-Assay

Abkürzung	Definition
RPM	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkription
σ	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCF	<i>T-cell factor</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIFF	<i>tagged image file format</i>
TLE	<i>transducin like enhancer of split</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wg	<i>wingless</i>
WHO	World Health Organization
Wnt	<i>wingless type MMTV integration site</i>

1 Einleitung

1.1 Die Anfänge und Wurzeln des Wnt-Signalwegs

Einige wenige, evolutionär hoch konservierte Signalwege regulieren in der physiologischen Embryonalentwicklung das Zellwachstum und die auf Zell-Zell-Interaktionen beruhende Gewebeorganisation. Eine dieser Signalkaskaden ist der Wnt-(*wingless*)-Pfad. Ursprünglich wurde das *wingless* (*wg*) Gen in der Spezies *Drosophila melanogaster* als wichtiges Gen in der Segmentpolarisierung des Embryos während der Embryogenese identifiziert (Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980; Wodarz und Nusse 1998). Rijsewijk et al. konnten zeigen, dass das Proto-Onkogen *Int-1*, die bevorzugte genomische Integrationsstelle für das *mouse mammary tumor virus* (MMTV), das murine Homolog für *wg*, darstellt (Rijsewijk et al. 1987). Daraus wurde die Bezeichnung *Wnt1* (*wingless type MMTV integration site*) geprägt.

Die Familie der *wnt* Gene kodiert für eine Gruppe aus Cystein-reichen Glykoproteinen mit einer Länge von 350 – 400 Aminosäuren, welche sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine herausragende Rolle in der Zelldifferenzierung, Segmentierung, Proliferation und Motilität spielen (Clevers 2006; Nusse 2005). Inzwischen sind in Säugetieren 19 verschiedene Wnts identifiziert worden (Vgl. The Wnt Homepage <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Als extrazelluläre Signalproteine sind diese in eine Vielzahl von Mechanismen involviert, die überwiegend lokal, d.h. parakrin oder autokrin, interzelluläre Kommunikation vermitteln. Aufgrund ihrer chemischen Struktur als hydrophobe, palmitoylierte Glykoproteine sind sie für eine Bindung an Heparinsulfat, ein Proteoglykan der extrazellulären Matrix (ECM), prädestiniert (Mikels und Nusse 2006a). Dadurch wird einerseits der Zell-Zell-Transport moduliert, andererseits entstehen morphogenetische Konzentrationsgradienten.

Der Effekt der Wnt-Proteine ist rezeptor- und kontextabhängig, lässt sich jedoch im Wesentlichen zwei Signalkaskaden zuordnen: (1) dem kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg, auch als klassischer Weg bezeichnet, und (2) den nichtkanonischen Signalkaskaden: dem *planar cell polarity*-(PCP)-Signalweg und dem Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg.

1.2 Der Kanonische Wnt-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin bzw. der kanonische Signalweg ist die am besten definierte Signalkaskade, diese ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Eine zentrale Rolle nimmt dabei das Protein β -Catenin ein (van Noort et al. 2002). In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β -Catenin durch einen Degradationskomplex, bestehend aus dem Protein Axin, dem Tumorsuppressor adenomatosis Polyposis coli (APC), der Casein-Kinase $\text{I}\alpha$ (CKI α) und der Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β), an N-terminalen

Serin/Threonin-Resten durch die beiden Kinasen phosphoryliert (Hart et al. 1998; Yost et al. 1996). Durch diese Phosphorylierung wird β -Catenin der Ubiquitinierung zugeführt (Aberle et al. 1997). Das polyubiquitinierte β -Catenin wird anschließend im Proteasom degradiert und steht der Signalkaskade nicht mehr zur Verfügung.

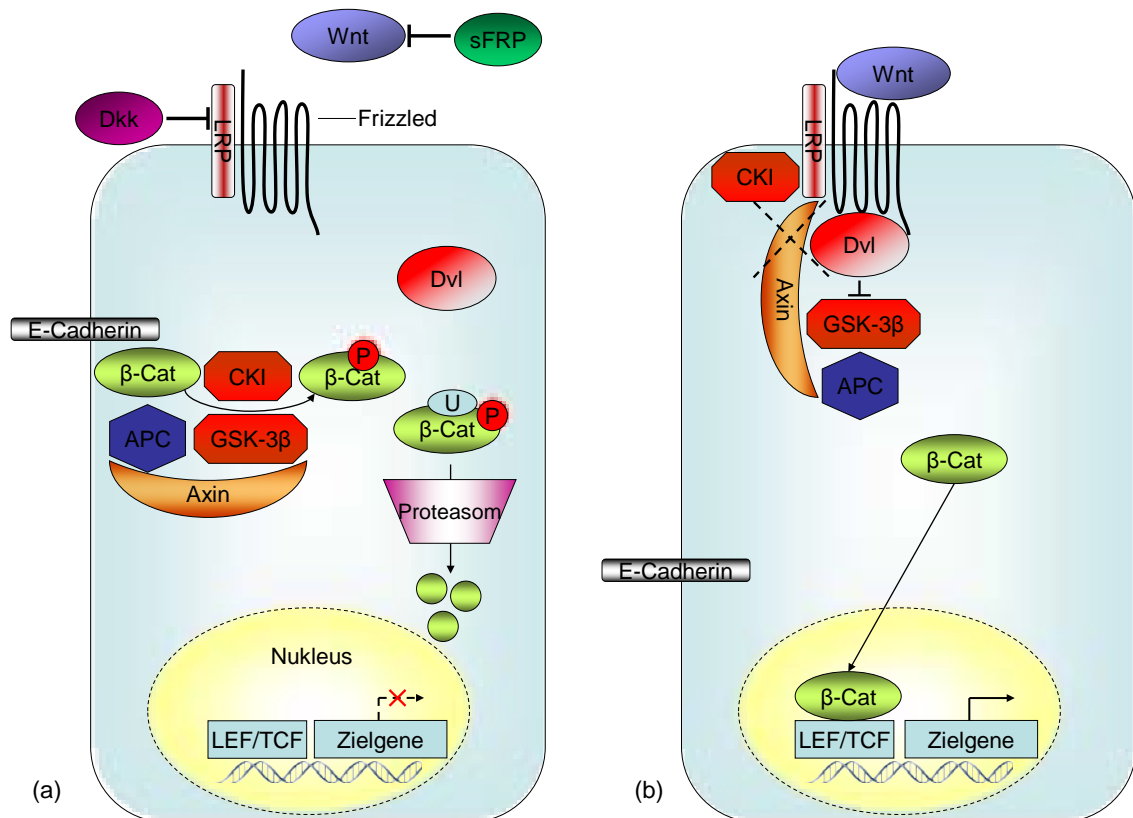


Abbildung 1.1: Der kanonische Wnt-Signalweg im (a) inaktiven und (b) aktivierten Zustand; nach Aktivierung des Signalweges durch Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptorkomplex aus Fz und LRP wird die Phosphorylierung von β -Catenin inhibiert und β -Catenin transloziert in den Nucleus und aktiviert die Transkription der entsprechenden Zielgene. Details und Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen, nach Moon et al. 2004, S. 691.

Der Rezeptorkomplex für die Wnt-Liganden besteht aus einem Vertreter der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren der *Frizzled* (Fz)-Familie und dem Korezeptor *lipoprotein related protein 5/6* (LRP 5/6) (Bhanot et al. 1996; Pinson et al. 2000; Wehrli et al. 2000). Kommt es zu einer Bindung eines Wnt-Moleküls an den extrazellulären, Cystein-reichen N-Terminus eines Fz-Rezeptors, wird das intrazelluläre Protein *Dishevelled* (Dvl) an das Amino-terminale Ende von Fz rekrutiert und phosphoryliert (Wallingford und Habas 2005). Der genaue Mechanismus der Rekrutierung und Phosphorylierung von Dvl durch den Ligand-Rezeptor-Komplex ist im Augenblick noch unklar. Jedoch bindet der nur eine Transmembrandomäne enthaltende Korezeptor LRP 5/6 (He X et al. 2004) in aktiviertem Zustand, d.h. nach Phosphorylierung durch die CKI γ , Axin an seinem zytoplasmatischen Ende (Davidson et al. 2005; Price 2006).

Daraufhin bilden an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptorkomplexes Dvl und Axin ein Heterodimer. Wahrscheinlich vermittelt die Interaktion der *Dishevelled*-Axin (DIX)-Domänen von Dvl respektive Axin die weitere Signaltransduktion (Clevers 2006).

Die Anlagerung Axins an LRP und phosphoryliertes Dvl führt zu einem Abbau des Axins und einer Dissoziation des Degradationskomplexes aus GSK-3 β , CKI α , Axin und APC (Tolwinski und Wieschaus 2004). Zudem inhibiert aktiviertes Dvl die GSK-3 β . Durch diese zwei konvergenten Mechanismen unterbleibt die Phosphorylierung des zytoplasmatischen β -Catenins und es findet eine Translokation des akkumulierten, unphosphorylierten β -Catenins in den Nukleus statt. Wie diese Translokation vermittelt wird, ist augenblicklich noch nicht geklärt (Clevers 2006). Ein wichtiger Mittler scheint jedoch APC zu sein.

Die nukleären Bindungspartner von β -Catenin sind die DNA-Bindungsproteine der *lymphoid enhancer factor/T-cell factor*-(LEF/TCF)-Familie (Behrens et al. 1996; Huber et al. 1996; Molenaar et al. 1996). Die LEF/TCFs sind eine Untergruppe der *high mobility group*-(HMG)-Familie von Transkriptionsfaktoren (Hoppler und Kavanagh 2007). Die DNA-Bindung erfolgt über die, diese Familie definierende, HMG-Domäne, wobei LEF/TCFs keine intrinsische Transkriptionsfaktoraktivität aufweisen. Bei ausbleibendem Wnt-Signal, d.h. in Abwesenheit nukleären β -Catenins, wirken die TCF/LEFs als Transkriptionsrepressoren der Wnt-Zielgene. Verantwortlich dafür sind Korepressoren wie *C terminal binding protein* (CtBP) und *transducin like enhancer of split* (TLE) (Chinnadurai 2002; Roose et al. 1998). Beide Korepressoren interagieren mit Histondeacetylasen, welche das Kernchromatin in einem inaktivem Transkriptionsstatus halten (Daniels und Weis 2005). Durch phosphoryliertes β -Catenin wird eine Verdrängung der Korepressoren aus dem Komplex ausgelöst. Anschließend wird durch die Koaktivatoren der Transkription *Creb-binding-protein* (CBP) (Takemaru und Moon 2000) und *B-cell-lymphoma-9-2* (BCL-9-2) (Brembeck et al. 2004) die Transkription initiiert.

Als Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges identifiziert wurden unter anderem die den Zellzyklus regulierende Kinase *cyclin d1* (Shtutman et al. 1999; Tetsu und McCormick 1999), die Onkogene *c-myc* (He TC et al. 1998) und *c-jun* (Mann et al. 1999), die Matrix-Metalloprotease (MMP) *matrilysin* (*mmp-7*) (Brabletz et al. 1999; Crawford et al. 1999), das Zell-Zell- und Zell-ECM-Adhäsionsmolekül *cd44* (Wielenga et al. 1999), der *urokinase plasminogen activator receptor* (*upar*) (Mann et al. 1999) und der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (*vegf*) (Zhang et al. 2001). Alle diese Gene spielen eine wichtige Rolle sowohl in der physiologischen Entwicklung und Differenzierung von Geweben als auch in der Tumorgenese.

Aus dieser Tatsache resultiert die Notwendigkeit einer sorgfältigen Aufrechterhaltung der Wnt-Homöostase. Ein wichtiges Mittel hierzu stellen die sezernierten Wnt-Inhibitoren dar. Diese lassen sich funktionell in zwei Kategorien einteilen: Die *secreted Frizzled-related protein* (sFRP)-Klasse komplexiert aufgrund ihrer Homologie zum Fz-Rezeptor freie Wnt-Liganden (Lin K et al. 1997) und unterbindet damit eine

Bindung an den spezifischen Rezeptor. Der *Wnt inhibitory factor 1* (WIF1) ist aufgrund seiner ebenfalls extrazellulären Wirkung ebenfalls dieser Gruppe zuzuordnen (Kawano und Kypta 2003). Währenddessen bindet die Familie der Dickkopf (Dkk)-Proteine an den LRP5/6-Anteil des Wnt-Rezeptorkomplexes (Mao et al. 2001). Ob daraus eine spezifische Inhibition des kanonischen Signalweges resultiert ist im Augenblick noch umstritten.

Einen weiteren bedeutenden Regulator der signalaktiven β -Catenin-Menge ist das Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmolekül E-Cadherin (Moon et al. 1993). An seinem zytoplasmatischem Ende erfolgt eine Bindung β -Catenins. Über das Adapterprotein α -Catenin wird weiterhin eine Bindung an Aktin vermittelt (Polakis 2000). Daraus resultiert eine Integration von β -Catenin in das Zytoskelett. In der Summe ergibt sich somit eine Abnahme des für das kanonische Wnt-Signaling zur Verfügung stehenden β -Catenins (Nelson und Nusse 2004).

1.3 Die Nichtkanonischen Wnt-Signalwege

Die verschiedenen Mitglieder der Wnt-Familie weisen unterschiedliche Präferenzen für die verschiedenen Signalwege auf. Zu den Aktivatoren des klassischen Wnt-Signalweges werden Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3a, Wnt-7, Wnt-7a und Wnt-8a gezählt (Du et al. 1995; Wong et al. 1994). Diese Liganden werden als Wnt-1-Klasse mit hohem onkogenem Potential zusammengefasst, da im murinen Modell eine Überexpression dieser Proteine in benignen Brustzellen zu deren maligner Transformation führt (Wong et al. 1994).

In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass neben dem kanonischen Signalweg auch β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege existieren. Diese werden durch die Klasse der Wnt-5a-Proteine, der neben Wnt-5a auch Wnt-4 und Wnt-11 angehören, aktiviert. All diesen Wnts ist ein geringes transformatorisches Potential eigen (Wong et al. 1994).

Eine wichtige Rolle bezüglich der Entscheidung, welcher der möglichen intrazellulären Signalwege aktiviert wird, kommt dem Multidomänenprotein Dvl zu. Neben der schon erwähnten N-terminalen DIX-Domäne weist Dvl noch eine zentrale PDZ-Domäne, welche Proteinbindungen und damit Proteininteraktionen vermittelt, und eine C-terminale DEP-Domäne, welche mit GTPasen interagiert und die subzelluläre Lokalisation von Dvl moderiert, auf (Wallingford und Habas 2005). Die spezifische Mittlung zwischen Rezeptoraktivierung und Dvl-Phosphorylierung ist noch nicht verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass insbesondere die PDZ- und DEP-Domänen wesentlich sind für die Kanalisierung des Wnt-Signals in entweder den kanonischen Weg oder die nichtkanonischen Pfade. Wesentliche Vertreter der letzteren Gruppe sind unter anderem der PCP- und der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Wallingford und Habas 2005).

Eine vergleichende, schematische Gegenüberstellung unter Berücksichtigung aller im Folgenden erläuterten Signalwege ist der Abbildung 1.2 zu entnehmen.

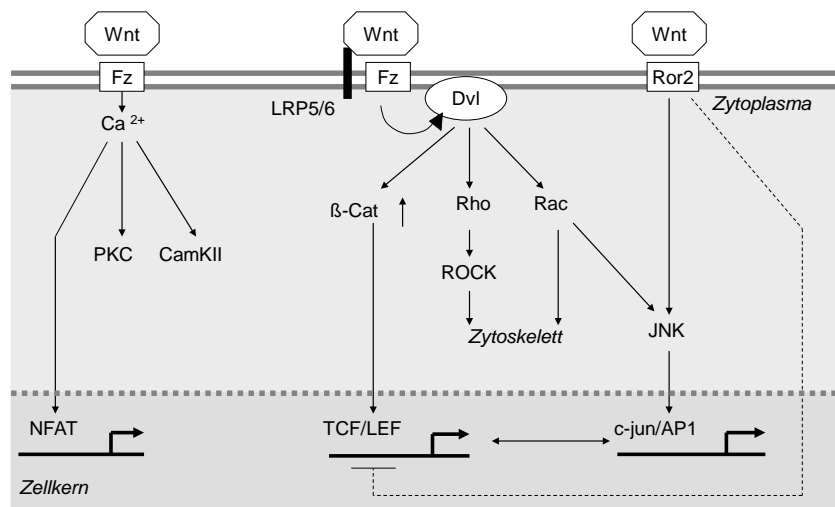


Abbildung 1.2: Überblick der verschiedenen Wnt-Signalwege und ihre möglichen Interaktionen. Details und Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen, nach Pukrop und Binder 2008, Seite 260.

1.3.1.1 Planar-Cell-Polarity-Signalweg

Der Begriff der *planar cell polarity* (PCP) beschreibt die polare Ausrichtung epithelialer Zellen innerhalb einer Zellschicht. Zudem ist die PCP eine wichtige Voraussetzung für die gezielte Migration mesenchymaler Zellverbände in der Keimblattbildung, d.h. der Gastrulation während der vertebralen Embryogenese. Dieser Bewegung liegt die so genannte konvergente Extension, d.h. die Interkalation und Extension mehrschichtiger Zellverbände, zu Grunde. Zudem ist in Säugern eine Aktivierung des PCP-Signalweges durch Wnt-5a in der embryonalen Entwicklung der murinen Cochlea beschrieben (Qian et al. 2007).

Aus der Vielzahl der möglichen Rezeptor-Liganden-Konstellationen sind insbesondere die nichtkanonischen Wnts Wnt-5a und Wnt-11 sowie die Rezeptoren Fz3, Fz5 und Fz6 in die Aktivierung des PCP-Signalweges involviert (Seifert und Mlodzik 2007). Die Anwesenheit des Korezeptors LRP ist für diese Aktivierung des PCP-Signalweges über Fz-Rezeptoren durch Wnt-Liganden nicht zwingend.

Die Ausbildung des Fz-Dvl-Komplexes im Rahmen des PCP-Signalweges führt zur Aktivierung der beiden intrazellulären kleinen GTPasen RhoA und Rac. Dadurch ergibt sich eine Dichotomie des weiteren Signalweges. Während durch RhoA die Rho-assoziierte-Kinase (ROK) aktiviert wird (Winter et al. 2001), bewirkt Rac eine Phosphorylierung der c-jun-N-terminalen Kinase (JNK) (Moriguchi et al. 1999). Als Hinweis für einen Synergismus der obigen Signalkaskaden läßt sich die Gastrulation in Vertebraten heranziehen – hier sind beide Wege Voraussetzung (Habas et al. 2003).

Durch ROK erfolgt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts: es findet eine Elongation der Aktinfasern und ihre Quervernetzung durch Myosinketten statt. Dies ist wesentlich für eine Kontraktilität der Zelle. Darüber hinaus modelliert und stabilisiert RhoA die zytoplasmatischen Mikrotubuli, vermittelt eine Reifung der

Punkt-desmosomen und koppelt Aktinfilamente und Mikrotubuli an die fokalen Adhäsionskomplexe (Watanabe et al. 2005). Zudem scheint in *Drosophila melanogaster* die korrekte Lokalisation E-Cadherins ROK-abhängig zu sein (Mirkovic und Mlodzik 2006; Seifert und Mlodzik 2007).

Die Aktivierung von Rac ist eine wichtige Voraussetzung für die Aktin-Polymerisation und die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien an der Zellfront (Wehrle-Haller und Imhof 2003). Außerdem phosphoryliert die durch Rac aktivierte JNK das Protein c-jun (Weber et al. 2000), das eine Komponente des dimeren Transkriptionsfaktorkomplexes *activator protein 1* (AP-1) ist. Somit wird durch den Rac-Arm des PCP-Signalweges auch eine Regulation auf Transkriptionsebene ausgelöst.

Das Zusammenwirken dieser Signale induziert einen promigratorischen Phänotyp der Zelle bzw. von Zellverbänden. An der migratorischen Front der Zelle führt Rac zu einer zunehmenden Filopodienbildung, während RhoA die fokalen Adhäsionen maturiert, das Aktin- und Mikrotubulizytosklett integriert und eine Retraktion des distalen, d.h. des dem Migrationsvektor abgewandten Zytoplasmas, bewirkt.

Es bestehen zahlreiche Berührungspunkte zwischen dem PCP-Signalweg und dem kanonischen Wnt-Signalweg mit teilweise synergistischen, aber auch antagonistischen Effekten. So kann zum Beispiel Wnt-5a, unabhängig von der GSK-3 β , in Anwesenheit von APC die Degradation von β -Catenin fördern (Topol et al. 2003). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Wnt-5a an Ror2, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die nicht zu den Fz-Rezeptoren gehört, bindet (Oishi et al. 2003; Schambony und Wedlich 2007). Dadurch wird unabhängig von den GTPasen der β -Catenin-Signalweg inhibiert (Mikels und Nusse 2006b). Andererseits kann über den PCP-Signalweg phosphoryliertes c-jun die Wirkung von TCF-4 des kanonischen Signalweges verstärken (Nateri et al. 2005).

1.3.1.2 Wnt/Ca²⁺-Signalweg

Analog dem PCP-Signalweg wird auch dieser nicht-kanonische Signalweg durch Wnts mit niedrigem transformierendem Potential aktiviert. Erneut ist insbesondere in Vertebraten ein wichtiger Vertreter dieser Liganden Wnt-5a (Slusarski et al. 1997b). So beruht im Xenopus- und Zebrafischembryo die dorso-ventrale Körperachsenorientierung auf einer Balance zwischen dorsaler Wnt-8 vermittelter nukleärer β -Catenin Lokalisation und ventraler Wnt-5a vermittelter Calciumfreisetzung (Slusarski und Pelegri 2007). An diesem Beispiel zeigt sich zudem eine mögliche Interaktion der obigen Signalwege. Wie in den bisher geschilderten Wnt-vermittelten Signalkaskaden benötigt auch der Ca²⁺-Signalweg sowohl Fz-Rezeptoren als auch die PDZ- und DEP-Domänen von Dvl als intrazellulären Mittler (Sheldahl et al. 2003).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des murinen Fz2-Rezeptors zur Dissoziation eines rezeptorständigen heterotrimeren G-Proteins führt. Durch dessen G α_i -Untereinheit erfolgt eine Aktivierung der für das zyklische Guonosinmonophosphat (cGMP) spezifischen Phosphodiesterase 6 (PDE6), welche einen Abfall des intrazellulären, sekundären Botenstoffes cGMP bewirkt. (Ahumada et

al. 2002; Wang et al. 2004; Wang und Malbon 2003). Als Effektor dieses cGMP-Abfalles fungiert die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) (Ma und Wang 2006), deren Aktivität durch den intrazellulären cGMP-Spiegel reguliert wird.

Parallel zu diesen Vorgängen erfolgt eine gesteigerte Synthese der intrazellulären, sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Slusarski et al. 1997a). Dieser Effekt wird am ehesten durch die Gβγ-Untereinheit des obigen G-Proteins verursacht, welche über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die Spaltung von PIP₂ in IP₃ und DAG vermittelt (Slusarski und Pelegri 2007). Während der sekundäre Messenger IP₃ durch Bindung an endoplasmatische IP₃-Rezeptoren (IP₃-R) einen Ca²⁺-Einstrom in das Zytoplasma verursacht, wird durch DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Sheldahl et al. 1999; Slusarski et al. 1997b). Die Aktivierung der PKC ist wiederum Ca²⁺-abhängig. Der oben geschilderte Wnt-vermittelte Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration bewirkt darüber hinaus über die Bindung von Ca²⁺ an das regulatorische Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin (CaM) eine Aktivierung eines weiteren Ca²⁺-sensitiven Proteins – der *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* (CamKII) (Kuhl et al. 2000a; Kuhl et al. 2000b). Ebenso ermöglicht der CaM/Ca²⁺-Komplex eine Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche wiederum den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of T cells* (NFAT) aktiviert.

In der Summe bewirken die oben genannten Prozesse nicht nur eine direkte Phosphorylierung der Zielproteine des Wnt/Ca²⁺-Signalweges über die PKC und CamKII, sondern auch eine Beeinflussung der Genexpression über NFAT.

1.4 Die Wnt-Signalwege in der Genese und Progression des Mamma-Karzinoms

Maligne Neoplasien der Mamma zählen zu den häufigsten Tumoren bei Frauen in den westlichen Industrieländern. Entsprechend dem Vorschlag der World Health Organization (WHO) (1981) werden die Mamma-Karzinome in 2 histologische Gruppen unterteilt: (1.) nicht-invasive Karzinome (Carcinoma in situ) und (2.) invasive Karzinome. Die häufigsten histologischen Tumorformen umfassen das infiltrierende duktales (75%), das lobulär invasive (10%), das medulläre und das Kolloid-Karzinom (3-5%). Seltenerer Formen sind das tubuläre, das adenozytische und das papilläre Karzinom. Von den invasiven duktales Karzinomen hat das differenzierte tubuläre Karzinom die günstigste Prognose. Mehrere Parameter haben sich zur Abschätzung der Prognose nach der Primär-Operation und zur Festlegung des weiteren therapeutischen Vorgehens etabliert: der Lymphknotenstatus, die Expression von Hormonrezeptoren und die Amplifikation des Gens *erb-B2* (*Her2/neu*). Tumoren mit Befall der axillären Lymphknoten haben eine signifikant schlechtere Langzeitprognose als nodalnegative Karzinome (Fisher et al. 1990; Sauer et al. 1992; Schauer et al. 1991). Ebenso weisen Patientinnen, deren Tumoren eine *erb-B2*-Amplifikation zeigen, eine schlechtere Prognose auf. Dagegen bedeutet die Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren ein deutlich verlängertes rezidivfreies und Gesamtüberleben

(Berchuck et al. 1990; Sauer et al. 1992; Schauer et al. 1991; Slamon et al. 1989; Varley et al. 1987).

Wie bereits geschildert (Vgl. 1.1), verwies die Entdeckung, dass in der Maus die ektopische Aktivierung von Wnt1 durch das MMTV zu einer malignen Transformation des Brustgewebes führt, auf das onkogene Potential des Wnt-Signalweges und warf die Frage nach einer analogen Bedeutung im Menschen auf. Zudem legt die Tatsache, dass viele Wnt-Liganden während der Adoleszenz, Schwangerschaft und Laktation in dynamischer Weise im benignen Brustgewebe exprimiert werden (Brennan und Brown 2004; Smalley und Dale 2001), eine Beteiligung bei malignen Prozessen nahe.

Immunhistochemische Untersuchungen an Brustkrebsproben zeigten dann auch insbesondere in lobulären Karzinomen eine erhöhte β -Catenin-Expression (Karayiannakis et al. 2001). Zudem erwies sich in einer weiteren Untersuchung eine deutliche Korrelation zwischen nukleärer β -Catenin-Lokalisation, Cyclin d1-Expression und schlechter Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens im untersuchten Patientenkollektiv (Lin SY et al. 2000).

Weiterhin konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen der LEF-1- und erb-B2-Proteinexpression in invasiven duktalem Mammakarzinomen gezeigt werden. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache, dass in vitro funktionelles LEF-1 für die Invasion von Brustkrebszellen benötigt wird, untermauert (Nguyen et al. 2005).

Überraschenderweise ist, im Gegensatz zu vielen anderen Malignomen, nur in Ausnahmefällen eine Mutation des *apc* oder des *β -catenin* für die nukleäre Akkumulation von β -Catenin und die folgende LEF-1-Aktivierung verantwortlich (Candidus et al. 1996; Sorlie et al. 1998).

Eine mögliche Erklärung wäre die vermehrte Verfügbarkeit von klassischen Wnt-Liganden, d.h. eine in der Signalkaskade mehr aufwärts gelegene Ursache. Jedoch erwies sich die Suche nach einer Überexpression von Wnt-1 im humanen Mammakarzinom ebenfalls als vergeblich (Van de Vijver und Nusse 1991).

Weitere Studien konnten dann auch mittels in-situ-Hybridisierung eine gegenüber gesundem Brustgewebe vermehrte Wnt-2-Expression in humanen, duktalem Mammakarzinomen nachweisen (Dale et al. 1996). Diese beruhte allerdings nicht auf einer erhöhten Kopienanzahl von *wnt-2*. Vielmehr scheint eine autokrine Wnt-2-Sekretion vorzuliegen, welche durch eine parakrine Wnt-2-Sekretion durch die umgebenden Fibroblasten unterstützt wird.

In Bezug auf Wnt-5a, einen Aktivator der nichtkanonischen Wnt-Signalwege, ist die Datenlage widersprüchlich. So gibt es einerseits durch in-situ-Hybridisierungen gegen Wnt-5a Hinweise darauf, dass dieses in den epithelialen Zellen von Brustkrebsbiopsien gegenüber Normalgewebe überexprimiert wird. Andererseits wird in einer immunhistochemischen Analyse ein Verlust der Wnt-5a-Expression als ein unabhängiger positiver prognostischer Marker bezüglich der Rezidivwahrscheinlichkeit des invasiven duktalem Mammakarzinoms postuliert (Jonsson et al. 2002).

Neben der vermehrten Verfügbarkeit von kanonischen Wnt-Liganden im Mammakarzinom und der daraus resultierenden Aktivierung des klassischen Wnt-Signalweges besteht eine weitere Erklärung des erhöhten intrazellulären β -Catenin-Angebots in der veränderten E-Cadherin-Expression. Diese ist im Brustkrebsgewebe oftmals deutlich vermindert (Glukhova et al. 1995), woraus indirekt ein vergrößertes β -Catenin-Angebot für eine aberrante Signaltransduktion resultieren könnte (Smalley und Dale 2001).

Zusammenfassend lässt sich somit im humanen Mammakarzinom insbesondere eine Aktivierung des klassischen Wnt-Signalweges postulieren, deren Genese ist jedoch augenblicklich noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.5 Die Bedeutung und Zusammensetzung des Tumor-Mikroenvironments

Ausgehend von der Zellularpathologie Rudolf Virchows standen in der Betrachtung maligner Tumoren überwiegend die eigentlichen Tumorzellen im Vordergrund der wissenschaftlichen Betrachtung. In diesem Modell der Karzinogenese erhalten die Krebszellen durch genetische und epigenetische Alterationen (Vogelstein und Kinzler 1993) (1.) die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, (2.) die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3.) die Vermeidung des programmierten Zelltodes, d.h. der Apoptose, (4.) die Fähigkeit zur grenzenlosen Replikation, (5.) die Unterhaltung einer anhaltenden Angiogenese und (6.) die Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000).

Jedoch postulierte schon Virchow neben der „örtlichen Veranlassung, [...] welche die Entstehung der Geschwulst an einer bestimmten Stelle bedingt“ eine „begünstigende Einrichtung der Stelle“, d.h. eine lokale Prädisposition (Hauptmann und Schnalke 2001, S. 292). In den letzten Jahren hat diese Betrachtungsweise eine Renaissance erfahren. So wird nunmehr dem Tumor-Mikroenvironment, d.h. den umgebenden, benignen zellulären und azellulären Gewebsanteilen eines Tumors, eine herausragende Rolle in der Tumorerhaltung und –progression zugeschrieben.

Die wesentlichen Bestandteile dieses Tumor-Mikroenvironments sind einerseits die unlöslichen Strukturproteine der tumorspezifischen extrazellulären Matrix (ECM) und darin eingebettete, lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, andererseits die nicht-malignen diploiden Wirtszellen des Organismus (van Kempen et al. 2003; Witz und Levy-Nissenbaum 2006). Neben der strukturellen und räumlichen Einheit stellen das Mikroenvironment und der zugehörige maligne Tumor jedoch auch eine funktionelle Einheit dar, welche durch vielfältige Interaktion und wechselseitige Beeinflussung charakterisiert ist. In ihrer Art spiegelt diese Einheit eine „Wunde, welche nicht heilt“ wider (Dvorak 1986). Im Zirkelschlag zu Virchow, welcher als wichtiges Beispiel der oben genannten lokalen Prädisposition ein leukoretikuläres Infiltrat beschrieben hat, ist das Konzept einer die Malignität

begünstigenden und unterhaltenden chronischen Entzündung zurückgekehrt (Balkwill und Mantovani 2001).

Zu den wichtigsten Vertretern der an diesen inflammatorischen Geschehnissen beteiligten Zellpopulationen gehören neben den ortsständigen Fibroblasten die infiltrierenden Leukozyten, zu denen neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, T-Lymphozyten, Natural-Killer-(NK)-Zellen und Makrophagen. Die Makrophagen, welche in diesem Kontext als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet werden, nehmen hierbei eine bedeutende Stellung ein (Condeelis und Pollard 2006; Mantovani 1989; Mantovani et al. 1992).

In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand können sie eine Fülle von unterschiedlichen Prozessen wie Zytotoxizität, Angiogenese, ECM-Degradation und Antigenpräsentation beeinflussen (Lewis und Pollard 2006). Dem zu Grunde liegt das Modell der Makrophagen-Balance (Mantovani et al. 1992) und der damit einhergehenden Polarität des Phänotyps dieser Zellen. Während mikrobiologische Stimuli wie das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Membran gramnegativer Bakterien oder das Interferon- γ (IFN- γ) den, in Analogie zur Th1 Population der T-Helfer-Zellen, als M1 bezeichneten klassischen Phänotyp bewirken, führt eine Aktivierung über die Interleukine -4 und -10 (IL-4, IL-10) oder Immunkomplexe zum alternativen M2-Phänotyp (Mantovani et al. 2004b). Eine wesentliche Diskriminante dieser Polarität ist die unterschiedliche Expression von IL-12 und IL-10, welche einen IL-10^{low}/IL-12^{high}- bzw. einen IL-10^{high}/IL-12^{low}-Phänotyp der M1- respektive der M2-Makrophagen bedingt.

M1-aktivierte Makrophagen stellen überwiegend zytotoxische Effektorzellen, mit potentieller antitumoröser Aktivität, dar. Währenddessen unterhält der in TAMs vorherrschende M2-Phänotyp eine chronische Inflammation mit begleitender Gewebsneuorganisation und Angiogenese (Mantovani et al. 2004a; Sica et al. 2006).

Dies spiegelt sich in einer vermehrten Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren wie dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) wider. Weiterhin sezernieren M2-TAMs ECM-degradierende Matrix-Metalloproteasen (MMP) wie MMP-2 und MMP-9.

Ursächlich für die Rekrutierung und M2-Polarisierung der TAM sind die Tumorzellen. So exprimieren diese chemotaktische Zytokine (Chemokine) wie CCL2, welche eine vermehrte Migration von zirkulierenden Monozyten aus dem Gefäßsystem bewirken. Darüber hinaus bewirkt das Zytokin *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) neben seiner Funktion als Chemoattraktant eine erhöhte Viabilität der rekrutierten Makrophagen. IL-10, welches, wie oben dargestellt, den M2-Phänotyp sowohl verursacht als auch charakterisiert, blockiert eine Differenzierung der TAMs zu dendritischen Zellen. Somit wird die, in ihrer M1-Ausprägung, potentiell tumorzide Zellpopulation der Makrophagen durch die Tumorzellen in Richtung einer für sie vorteilhaften M2-Polarität gedrängt.

1.5.1 Die Tumor-assoziierten Makrophagen im Mammakarzinom

Untersuchungen aus Gewebsschnitten von Brustkrebspatientinnen zeigten, dass ein vermehrter immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen im Tumorpräparat nicht nur mit einer vermehrten Gefäßanzahl, sondern auch mit einer deutlichen schlechteren Prognose der Patientin bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens korreliert (Leek et al. 1996). Diese Beobachtung wird durch Tsutsui et al. gestützt, welche weiterhin eine Korrelation zwischen der Makrophageninfiltration, der VEGF-Expression und der Gefäßdichte im Tumor demonstrierten (Tsutsui et al. 2005). In einer weiteren retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass in aggressiven Mammakarzinomen, welche den Wachstumsfaktor-Rezeptor *erb-B2* (*HER2/neu*) aus der Familie der *endothelial growth factor*-(EGF)-Rezeptoren als Folge einer Genamplifikation überexprimieren, das Leukozyteninfiltrat des Tumors überwiegend aus Makrophagen bestand (Pupa et al. 1996). Im Einklang mit den obigen Ergebnissen konnten Leek et al. zeigen, dass in EGFR-negativen Tumoren die VEGF-Expression mit der Makrophageninfiltration korreliert. Jedoch ist die absolute Anzahl der infiltrierten Makrophagen in EGFR-positiven Tumoren höher (Leek et al. 2000).

Passend zu den klinischen Ergebnissen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass in einer CSF-1-defizienten Mauslinie die Makrophagenmigration in spontan entstandene Mammakarzinome deutlich vermindert ist. Daraus resultierte eine Verzögerung der Entwicklung hin zum invasiven und metastasierenden Karzinom mit deutlich reduzierter Anzahl von pulmonalen Metastasen. Dieser Effekt konnte durch die transgene Reexpression von CSF-1 im Brustdrüsenepithel rückgängig gemacht werden (Lin EY et al. 2001). Somit lassen sich eine invasionsfördernde Wirkung und die für die Metastasierung notwendige Anwesenheit von TAM ableiten. In vitro konnte diese Beobachtung durch Ko-Kultur-Studien von Brustkrebszellen und Makrophagen, welche eine Makrophagen-induzierte Invasionsteigerung der Tumorzellen in einem quantitativen Invasionsassay zeigen, validiert werden (Hagemann et al. 2004).

Ein Mechanismus, über den diese Wirkung abläuft, stellen die ECM-spaltenden MMPs dar. So wurde nachgewiesen, dass die Ko-Kultur von Makrophagen mit Brustkrebszellen mit einer deutlich erhöhten Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 durch die Makrophagen einhergeht (Hagemann et al. 2004). Neben der Digestion der ECM und der Basalmembran im Rahmen von Invasion und Metastasierung werden durch MMPs auch ECM- und Zellmembran-gebundene Zytokine und Wachstumsfaktoren aus inaktiven Vorstufen proteolytisch aktiviert (Noel et al. 2008).

Ein Vertreter dieser Zytokine ist der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), welcher durch MMP-7 aus seiner unlöslichen, membrangebundenen Form in einen löslichen, aktiven Zustand überführt wird (Gearing et al. 1994; Ii et al. 2006). TNF- α besitzt verschiedene tumorfördernde Eigenschaften. Einerseits ist er ein Wachstumsfaktor für maligne Zellen. Andererseits begünstigt er einen pro-invasiven Tumorphänotyp (Szlosarek et al. 2006) über eine Erhöhung der Zellmotilität maligner Zellen, die Freisetzung pro-

angiogenetischer Faktoren wie VEGF sowie die in einer autokrinen Schleife induzierte MMP-Sekretion.

1.5.2 Das Tumor-Mikroenvironment und Wnt-Signaling

Neben dem Tumor-immanenten Wnt-Signaling (Vgl. 1.4) gibt es jedoch auch Hinweise auf eine Wnt-Komponente in den TAMs. In Lysaten aus den Gewebeproben von Dickdarmkrebs-Patienten bzw. den respektiven Kontrollen aus nichtbefallenen Darmabschnitten konnte durch eine Arbeitsgruppe im Ribonuklease-Protektions-Assay (RPA) eine deutliche Steigerung der Wnt-5a-Expression um das Fünffache gegenüber dem normalen Gewebe gezeigt werden. Interessanterweise wiesen Dickdarmkrebs-Zelllinien *in vitro* keine Wnt-5a-Überexpression auf. Diese scheinbare Diskrepanz lässt sich durch die ergänzende *in-situ*-Hybridisierung gegen Wnt-5a und begleitende immunohistochemische Färbung gegen CD68, ein Makrophagen-Antigen, der Gewebsschnitte erklären, welche eine Kolo-kalisation der beiden Signale offenbart. Demzufolge wird die vermehrte Expression von Wnt-5a im Kolonkarzinom nicht durch die Tumorzellen, sondern durch die TAMs verursacht (Smith K et al. 1999).

Die in der Veröffentlichung von Smith K et al. geschilderte Beobachtung stellte zum Zeitpunkt der Konzeption dieser Promotion einen wichtigen Grundpfeiler für die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen dar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von den in den letzten Abschnitten geschilderten Prämissen sollte die Beteiligung des Wnt-Signalweges in der Interaktion zwischen Brustkrebszellen und den TAMs untersucht werden.

Dazu sollte zunächst ein Expressionsmuster von Liganden, Rezeptoren, Inhibitoren und Zielgenen des Wnt-Signalweges in Brustkrebszelllinien und Makrophagen erstellt werden, um eine weitergehende Charakterisierung eventueller Veränderungen dieses Expressionsmusters unter Ko-Kultur-Bedingungen durchführen zu können.

In Abhängigkeit der Resultate der Genexpressionsmuster sollte sich eine funktionelle Untersuchung der beteiligten Signalkaskaden auf Proteinebene durch Immunoblots und Immunofluoreszenzfärbungen anschließen.

Darauf aufbauend sollte der Einfluss des Wnt-Signalweges in der Makrophagen-induzierten Invasionssteigerung von Brustkrebszellen untersucht werden. Im Rahmen dieser Fragestellung wurden zunächst funktionelle *in-vitro*-Invasionsassays unter Zugabe von rekombinanten Wnt-Proteinen und deren Inhibitoren geplant. Darüber hinaus sollten zur Analyse der Aktivität und Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges in den Tumorzellen dominant negative LEF1-Konstrukte eingesetzt werden.

Weiterhin sollte die Interaktion zwischen dem Wnt-Signalweg und der MMP-Sekretion, einem etablierten Mechanismus der Invasion, durch Analyse der MMP-Produktion mittels Zymographie aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Die humanen Tumor-Zelllinien entstammen folgenden Quellen:

MCF-7: humanes Mamma-Adenokarzinom (HTB-22 American Type Cell Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA) (Soule et al. 1973). Erworben wurde diese Zelllinie über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland).

2.1.2 Bakterienstamm

Für die Transformation und Plasmidpräparationen wurde der kompetente *Escherichia coli* (E. coli)-Stamm TOP 5 (Invitrogen Europe, Paisly, UK) eingesetzt.

2.1.3 Chemikalien, Medien und Puffer

Die verwendeten Substanzen wurden entsprechend der folgenden Auflistung bezogen:

2.1.3.1 Chemikalien

Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Brij-35	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform:Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Blau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tris-HCl Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Triton X-100 Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.3.2 Zellkulturmedien und Lösungen

ECM Sigma, Deisenhofen, Deutschland

FCS Sigma, Deisenhofen, Deutschland

LB-Agar Invitrogen Europe, Paisly, UK

LB-Medium Invitrogen Europe, Paisly, UK

PFA 4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS

rekombinantes, humanes Dkk1 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

rekombinantes, murines Wnt-5a R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

RPMI 1640 Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Trypsin-EDTA 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA (w/v) in PBS
Biochrom, Berlin, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

6-Napf-Zellkulturschalen Nunc, Wiesbaden Deutschland

21,5-cm²-Zellkulturschalen Nunc, Wiesbaden Deutschland

25-cm²-Zellkulturflaschen Nunc, Wiesbaden Deutschland

75-cm²-Zellkulturflaschen Nunc, Wiesbaden Deutschland

Glaspasteurpipetten 230 mm WU Laborglaswaren, Mainz, Deutschland

Polykarbonatmembran Nucleopore, Pleasanton, CA, USA
(10 µm Porengröße)

Serologische Auslaufpipetten Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
10 ml, ¹/₁₀ Gradierung

Serologische Auslaufpipetten Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
5 ml, ¹/₁₀ Gradierung

Zellkultureinsätze Millipore, Eschborn, Deutschland
(12 mm, 4 µm Porengröße)

Zellkultureinsätze Millipore, Eschborn, Deutschland
(30 mm, 4 µm Porengröße)

Zellschaber Greiner Bio-One, Frickenhausen Deutschland

2.1.5 Geräte

CO ₂ -Inkubator MCO-17 AC	Sanyo, Etten-Leur, Niederlande
Flachbettscanner Ricoh Aficio MP 161	Ricoh, Hannover, Deutschland
Heizblock Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
horizontale Agarosegel-Elektrophorese-Kammer Horizon58	Gibco, Heidelberg, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen, Deutschland
Inverses Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kühltischzentrifuge Hettich Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Laborzentrifuge Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Mikroskop-CCD Kamera AxioCam MRM	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Plattenphotometer Microplate Reader Model 680	BioRad, München, Deutschland
Quecksilber-Kurzbogenleuchte HBO 100	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank UVF 6.12S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermozykler Trio	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferapparat Fastblott B34	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transilluminator-CCD-Kamera	Intas, Göttingen, Deutschland
UV-Transilluminator Biometra TI 3	Biometra, Göttingen, Deutschland
vertikale SDS-Elektrophorese-Kammer Minigel Twin	Biometra, Göttingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte der Zellkultivierung, -isolierung und -ko-kultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank der Sicherheitsstufe II. Alle Arbeitsmaterialien wie Pipettenspitzen, Röhrchen, Kulturgefäße, Pasteur-Pipetten und Eppendorf-Gefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert oder waren durch den Hersteller steril verpackt.

Die verwendete Zelllinien wurde in dem Zellkulturmedium RPMI 1640, supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle drei Tage.

Bei Erreichen der Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen mussten diese abgelöst und gesplittet werden. Analog verhielt es sich bei der Gewinnung von Zellen für weitergehende Untersuchungen. Hierzu wurde der auf dem Boden der Kulturgefäße wachsende Zellrasen nach Absaugen des Überstandes zuerst mit PBS gespült, um noch vorhandene Mg²⁺- oder Ca²⁺-Ionen zu entfernen. Das Ablösen der Zellen wurde durch anschließende Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung und Einwirken über 5 - 15 min bei 37°C erreicht. Durch die folgende Zugabe von Kulturmedium mit FCS wurde das vorhandene Trypsin inaktiviert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit einer Pipette aspiriert. Je nach gewünschter Zellzahl wurden die Zellen in der jeweils notwendigen Konzentration in Petrischalen mit 21,5 cm² Fläche (5ml Suspension), Flaschen mit 25 cm² Fläche (5 ml Suspension) oder in Flaschen mit 75 cm² Fläche (10 ml Suspension) ausgesät.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Verwendung einer Neubauer-Zählkammer improved. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Zellsuspension, wurde die Konzentration durch den arithmetischen Mittelwert der Zellzahl in vier definierten Volumina von je 0,1 mm³ ermittelt.

2.2.3 Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut

Im Rahmen der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblutspenden erfolgt durch die Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Göttingen durch Zentrifugation eine Auftrennung der Spende in die verschiedenen zellulären und humoralen Fraktionen. Dabei entsteht neben dem Erythrozytenkonzentrat und dem Blutplasmaanteil der sogenannte *buffy coat*, welcher neben Resten von Erythrozyten den Großteil der Thrombozyten und Leukozyten der Spende enthält. Die *buffy coats* gesunder Blutspender, stellten das Ausgangsmaterial zur Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen dar.

Nach vorsichtiger Schichtung von 30 ml *buffy coat* auf 15 ml Ficoll-Lösung erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 2000 U/min ohne Bremse. Die Dichte des

Trennmediums Ficoll beträgt 1,077 g/ml, wodurch Zellen gleicher oder geringerer Dichte sich oberhalb des Trennmediums abscheiden, während Zellen höherer Dichte, d.h. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren. Die dadurch separierte Bande auf dem Trennmedium enthält alle mononukleären Zellen des peripheren Blutes, d.h. Lympho- und Monozyten (Boyum 1968).

Die somit separierten Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Durch eine erneute Zentrifugation bei 2000 U/min wurden die mononukleären Zellen von den mitüberführten Thrombozyten und Blutplasmaanteilen abgetrennt. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und bei 1000 U/min zentrifugiert. Das so gereinigte Zellpellet wurde in 25 ml serumfreien Kulturmedium resuspendiert und auf 5 Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 9 cm verteilt. Nach einer Inkubation von 2 h Dauer bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchte von 90 % wurde der Überstand verworfen, gefolgt von einem Mediumwechsel. Durch diesen Schritt wurden nicht-adhärenente Zellen, überwiegend Lymphozyten, entfernt.

Über einen Zeitraum von circa 10 - 14 Tagen wurden durch regelmäßige Mediumwechsel alle nicht-adhärenenten Zellen depletiert und die Differenzierung der verbleibenden Monozyten in Makrophagen beobachtet. Dies wurde durch eine begleitende mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Als Kriterien für eine erfolgreiche Differenzierung dienten eine zunehmende Zellspreizung, begleitet von Zellasymmetrie und progredienter Granularität des Zytoplasmas. Zwischenzeitlich erfolgte nach 7 Tagen eine Umstellung des Zellkulturmediums auf RPMI 1640 mit 1 % (v/v) FCS.

Zur Weiterverwendung der Makrophagen wurden diese mit einem Zellschaber abgeschabt, da ein Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung bedingt durch die starke Adhärenz der Zellen auf Plastik nicht möglich war.

2.2.4 Ko-Kulturversuche

2.2.4.1 Vorbemerkung

Zur Betrachtung der Interaktion zwischen Makrophagen und malignen Zellen wurden Ko-Kulturversuche dieser zwei Zelltypen durchgeführt. Um direkte Zell-Zell-Kontakte zu unterbinden und somit ausschließlich die Bedeutung sezernierter parakriner Faktoren untersuchen zu können, wurde in allen Ko-Kulturversuchen eine räumliche Trennung der Zellpopulationen vorgenommen. Dazu wurden die Makrophagen in Zellkultureinsätze ausgesät, deren Boden aus einer Kapillarporenmembran mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm bestand.

Die Größe der verwendeten Einsätze und die Anzahl der ausgesäten Zellen variierten je nach Versuchsaufbau. In allen Fällen war das Verhältnis Tumorzellen zu Makrophagen jedoch konstant 2 : 1.

Grundsätzlich ließen sich die durchgeführten Ko-Kulturversuche in zwei Untergruppen mit unterschiedlicher Zielsetzung aufteilen:

2.2.4.2 Analytische Ko-Kulturversuche

Zur Analyse von Expressionsmustern, Transkriptionsanalysen, Translationsveränderungen, Phosphorylierungszuständen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden zunächst die Tumorzelllinien mit einer Konfluenz von ca. 70 % in Zellkulturgefäße ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde erfolgte die Zugabe der Makrophagen, die zwischenzeitlich in den Zellkultureinsätzen ausgesät wurden. Nach Beendigung des Versuches erfolgte die Aufarbeitung der beiden Zelltypen getrennt, zum Beispiel zur RNA- oder Proteingewinnung.

2.2.4.3 In-vitro-Mikroinvasionsassay

Die Auswirkung der Ko-Kultur auf die in-vitro-Invasivität der malignen Zellen wurde in einem modifizierten Boyden-Kammer-Assay untersucht. Ursprünglich war diese Kammer entworfen worden, um das Migrationsverhalten von polymorphkernigen Leukozyten in Bezug auf verschiedene chemotaktische Stimuli zu untersuchen (Boyden 1962). Im Wesentlichen besteht diese Kammer aus zwei Kompartimenten, welche durch eine poröse Membran getrennt sind. Bedingt durch die Porengröße ist ein Flüssigkeitsaustausch zwischen den zwei Kompartimenten zwar möglich, Zellen können die Membran jedoch nur durch aktive Migration überwinden (Boyden 1962).

Für den Invasionsassay wurde die Polykarbonat-Membran zwischen den zwei Migrationskompartimenten mit ECM aus Engelbreth Holm-Swarm Maus Sarkom beschichtet. Der Porendurchmesser dieser Membran betrug 10 μm . Eine Durchwanderung dieser so behandelten Membran ist nicht durch Migration alleine möglich, sondern bedarf einer zusätzlichen proteolytischen Aktivität. Der Aufbau des modifizierten Mikroinvasionsassay ist in der Abbildung 2.1 dargestellt.

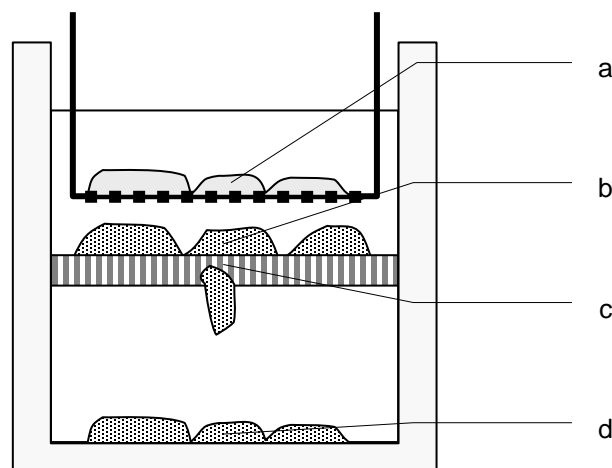


Abbildung 2.1: für in-vitro-Mikroinvasionsversuche modifizierte Boyden-Kammer, (a) Makrophagen in Zellkultureinsätzen, (b) Tumorzellen, (c) ECM-beschichtete Membran, (d) migrierte Zellen

Nach manueller Beschichtung der Membran mit eiskalter ECM-Lösung wurde diese auf das mit Medium befüllte Unterteil der Kammer gelegt, das Oberteil aufgelegt und

anschließend die beiden Hälften verschraubt. Zur Äquilibration der beschichteten Membran wurde die Kammer für 60 min im Zellkulturschrank inkubiert. Auf die Membran wurden die Tumorzellen ausgesät, die über weiter 60 min dann sedimentieren und adherierten. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze mit den Makrophagen in die obere Kammer eingebracht. Somit bestand auch in diesem Versuchsaufbau zwischen Tumorzellen und Makrophagen die Möglichkeit parakriner Kommunikation. Zur Bestimmung der Invasionsaktivität der Tumorzellen wurde die Anzahl der nach 96 h Ko-Kultur in der unteren Kammer befindlichen Zellen ausgezählt. Hierzu wurde der Inhalt der unteren Kammer nach Entfernung des Kammeroberteils und der Membran rigoros durch kräftiges Pipettieren resuspendiert, in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation mit 1000 g über 5 min pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml PBS und erneuter Pelletierung durch Zentrifugation wurde die Lösung auf 1 ml eingengt. Somit entsprach der in dem Haemocytometer erhobene Zahlenwert der Gesamtanzahl an invadierten Zellen.

Neben dem Auszählen in der Zählkammer wurde weiterhin der Inhalt der unteren Kammer mittels Zytopspin-Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht und durch Trocknen bei Raumluft fixiert und anschließend über 5 min mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet bevorzugt an DNA und ermöglicht somit eine Markierung des Zellkernes und damit eine Visualisierung der invadierten Zellen unter UV-Mikroskopie (Vgl. 2.2.14.4). Somit konnte der Anteil apoptotischer Zellen anhand ihres pyknotischen Zellkernes eingeschätzt werden. Zusätzlich wurde auch ein Auszählen der gefärbten Zellen in mehreren mikroskopischen Blickfeldern möglich (Hagemann et al. 2004).

2.2.5 RNA-Extraktion

2.2.5.1 Vorbemerkung

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden zwei verschiedene Methoden verwandt. Zur Weiterverwendung der RNA für eine qualitative PCR kam die Lyse der Zellen mit Guanidinium-Thiocyanat-Lösung, gefolgt von RNA-Extraktion mittels Phenol und Präzipitation der RNA mit Isopropanol zum Einsatz (Chomczynski und Sacchi 1987). Für RNA, welche für die cDNA-Arrays benötigt wurde, wurde das RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen, sterilen Pipettenspitzen und sterilen Reaktionsgefäßen durchgeführt, um eine Kontamination mit Ribonukleasen (RNAsen) weitestgehend zu vermeiden. Die Arbeitsschritte wurden generell auf Eis durchgeführt.

2.2.5.2 Reagenzien

GTC-Lyse-Puffer	4 M Guanidin-thiocyanat, 25 mM Natrium-Citrat, β -Mercaptoethanol (ME) auf 0.1 M frisch hinzufügen
Natrium-Acetat	272,2 g Natriumacetat-trihydrat in 800 ml H ₂ O lösen, pH auf 4,0 mit reiner Essigsäure einstellen, auf 1 l mit H ₂ O auffüllen

RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT-Puffer	Lysepuffer aus RNeasy-Kit, vor Verwendung 10 µl β-ME auf 1 ml RLT-Puffer zugeben
RW1-Puffer	aus RNeasy-Kit
RPE-Puffer	aus RNeasy-Kit, vor Verwendung Zugabe von 4 Volumen reinem Ethanol je 1 Volumen RPE-Konzentrat
RNase-freies H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H ₂ O, über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren

2.2.5.3 RNA-Extraktion nach der Guanidinium-Thiocyanat-Methode

Das chaotrope Salz GTC ist ideal zur Zelllyse geeignet und durch seine effektive Denaturierung von Proteinen ein potenter Inhibitor von RNAsen (Chirgwin et al. 1979). Dazu wurde das die Zellen bedeckende Medium zunächst mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit PBS (4°C) gewaschen, bevor sie mit 500 µl GTC-Lösung lysiert wurden. Das Lysat wurde mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Kulturschale gelöst und mittels einer Pipette in ein Eppendorf Gefäß (2 ml) überführt. Durch wiederholte Aspiration der Zellen durch eine 21 Gauge Kanüle wurde ein Scheren der genomischen DNA erreicht und die lysierten Zellen homogenisiert. Diesem Homogenisat wurden 50 µl Na-Acetat, 500 µl Phenol und 100 µl Chloroform:Isoamylalkohol zugesetzt und für 30 s kräftig vermischt. Durch die folgende Zentrifugation bei 4°C mit 13.000 g wurde das Gemisch in eine organische Phase, die Proteine und DNA enthielt und eine RNA-reiche, wässrige Phase aufgetrennt. Nach Abnahme der wässrigen Phase, wurde durch Zugabe einer isovolumetrischen Isopropanol-Menge und Inkubation über Nacht bei 4°C, die RNA gefällt. Die präzipitierte RNA wurde am nächsten Tag durch 20 min Zentrifugation mit 13.000 g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das RNA-Pellet wurde, nach 10 min Trocknen im offenen Eppendorf-Gefäß bei RT, in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.5.4 RNA-Extraktion mittels RNeasy-Kit

Aus 1×10^6 Tumorzellen oder 2×10^6 Makrophagen wurde gemäß den Angaben des Herstellers mittels des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) RNA gewonnen. Dieses Kit beruht auf der Bindung von RNA mit einer Basenlänge > 200 Nukleotiden an eine Silicagelmembran. Dadurch wurde eine Anreicherung der mRNA in der Lösung erreicht, da Teile der rRNA und tRNA kürzer als 200 Basen sind.

Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums und einer Waschung mit kaltem PBS wurden 350 – 600 µl Puffer RLT direkt auf die Zellen pipettiert, wodurch die Membranen der Zellen und Zellorganellen aufgeschlossen wurden. Mittels wiederholter Aspiration mit einer sterilen 21 G Kanüle wurden die Zellen komplett homogenisiert.

Dem Homogenisat wurden je nach Volumen 350 – 600 µl 70% (v/v) Ethanol hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Lösung in eine RNeasy-Säule überführt und 15 sec mit mindestens 8.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des ersten Eluats wurde der Säule 700 µl RW1-Puffer hinzugesetzt und erneut mit mindestens 8.000 g für 15 sec zentrifugiert. Auch das zweite Eluat wurde verworfen und das Sammelröhrchen nach diesem Schritt durch ein neues ersetzt. In zwei Schritten wurde die Membran dann mit 500 µl respektive 700 µl RPE-Puffer gewaschen und das Zentrifugat verworfen. Die abschließende Eluation der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem H₂O durch Zentrifugation für 1 min mit mindestens 8000g. Bei zu erwartender hoher RNA-Ausbeute wurde der letzte Eluationsschritt wiederholt.

2.2.5.5 Spektrometrische Nukleinsäuren-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der isolierten RNA bzw. DNA kann spektrophotometrisch erfasst werden. Die Absorption bei 260 nm entspricht der Menge der Nukleinsäuren (DNA, RNA) in der Probe. Die Absorption bei 280 nm gibt die kontaminierende Proteinkonzentration an.

Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} sollte bei einem proteinarmlen Isolat zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die RNA wurde im Verhältnis 1 : 1000 verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert. Die Absorption wurde bei 260 nm und 280 nm in Replikaten gemessen und die Konzentration der RNA nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$$

Die Extinktionskoeffizienten für Nukleinsäuren bei einer Weite der Küvette von 10 mm betragen: für doppelsträngige DNA 50,0; für einzelsträngige DNA und RNA 40,0 und für Oligonukleotide 25,0. Ein Wert von $A_{260} = 1,0$ (1 OD, $d = 10$ mm) entspricht somit einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml untersuchter Lösung.

2.2.6 Reverse Transkription

2.2.6.1 Vorbemerkung

Um die gewonnene RNA in einer PCR-Reaktion einsetzen zu können, erfolgte vorher eine Umschreibung in die komplementäre DNA (cDNA). Diese enthält, da sie auf gespleißter, reifer mRNA beruht, im Gegensatz zum *sense*-Strang der DNA keine Introns. Die reverse Transkription erfolgte mit oligo-(dT)-Primern, die an das Poly-A-Ende der vorliegenden mRNA-Moleküle binden und reverser Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV), entsprechend der Anweisung des Herstellers.

2.2.6.2 Materialien

oligo-(dT)-Primer	IBA, Göttingen, Deutschland
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
	je 10 µl mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP ad 100 µl

H₂O

RNase-Block I

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.2.6.3 Reagenzien

6	µl	5x First-Strand-Buffer	50 mM Tris-HCl; pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl ₂
1	µl	oligo-(dT)-Primer	1,5 µM
1,5	µl	dNTP-Mix	0,5 mM
0,6	µl	µl RNase-Block I	40 U/µl
2	µl	M-MLV-RT	200 U/µl

2 µg Gesamt-RNA wurden ad 19,9 µl Aqua bidest. verdinnt und zur Denaturierung der RNA 3 min auf 75°C im Thermozykler erhitzt, anschließend kurz anzentrifugiert und auf Eis gekühlt. Der Reaktionsansatz wurde hinzupipettiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 10 min erneut auf 75°C erwärmt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**2.2.7.1 Vorbemerkung**

Zur spezifischen, exponentiellen Amplifizierung einer gewünschten DNA-Sequenz wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Sie ermöglicht den spezifischen und sensitiven Nachweis von bekannten Zielsequenzen in einer DNA-Probe (Saiki et al. 1988). Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) verwendet, deren Sequenzen komplementär zu den flankierenden DNA-Abschnitten des gewünschten Fragmentes sind, d.h. sie dienen als Startpunkte für die thermostabile Taq-DNA-Polymerase zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Die Primer sind dabei so orientiert, dass die Elongationsprodukte als Ziel-DNA für weitere Amplifikationen dienen.

Die in-vitro-DNA-Synthese wird unter zyklischer Wiederholung von thermischer Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Primerelongation in einem Thermozykler durchgeführt. Die PCR besteht somit aus drei temperaturabhängigen Schritten, die in 25 bis 40 Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung der doppelsträngig vorliegenden DNA bzw. der cDNA in Einzelstränge bei 94°C.
2. Anlagerung (Annealing) der Primer an die genomische DNA bei 54°C bis 70°C. Die optimale Annealingtemperatur ermöglicht dem Primer an der spezifischen Zielsequenz zu binden. Eine Annäherung an die Annealingtemperatur des jeweiligen Primers gibt die folgende Formel: $4x(G+C)+2x(A+T)$ (Thein und Wallace 1986).
3. Elongation der 3' Primerenden durch die Taq-Polymerase bei 72°C.

2.2.7.2 β-Aktin-PCR

Um eine vergleichbare Effizienz der reversen Transkription und die Integrität der synthetisierten cDNA in den Proben zu bestätigen, wurde zusätzlich eine PCR für die

mRNA des Haushaltgens *β-Aktin* durchgeführt (Primer siehe Tabelle 2.2). Als Bestandteil des Zytoskeletts ist das hochkonservierte *β-Aktin* in allen eukaryonten Zellen enthalten.

In allen Reaktionen wurden 2 μl cDNA mit 9,5 μl des PCR-Reaktionsansatzes vermischt und mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 50 μl aufgefüllt.

Mastermix:	5,0 μl	10x PCR Puffer
(Angaben pro Probe)		(20 mM Tris-HCl; pH 8,4; 50 mM KCl)
	1,0 μl	MgCl ₂ (50 mM Stammlösung)
	1,0 μl	dNTP-Mix (0,5 mM)
	1,0 μl	Sense-Primer (100 pmol)
	1,0 μl	Antisense-Primer (100 pmol)
	0,5 μl	Taq-Polymerase (5 U/ μl)
	2,0 μl	cDNA aus dem Ansatz der reversen Transkription
ad	50,0 μl	μl Aqua bidest

Nach initialer Denaturierung der cDNA bei 94°C für 5 min, wurde die PCR-Reaktion entsprechend den Angaben der Tabelle 2.1 durchgeführt. Am Beginn eines jeden Zyklus stand dabei eine erneute Denaturierung der PCR-Produkte bei 94°C über 60 s.

Im Anschluss an den letzten Zyklus erfolgte, wie auch bei allen in Folge beschriebenen PCRs, bei 72°C für 5 min eine erneute Extensionsphase. Bis dahin noch unvollständige PCR-Fragmente konnten so verlängert werden. Danach wurde die Probe auf 4°C heruntergekühlt.

2.2.7.3 Qualitative PCR für Mitglieder des Wnt-Signalwegs

Der Mastermix wurde wie unter 2.2.7.2 beschrieben hergestellt. Empirisch wurden für die jeweiligen Gene die optimale MgCl₂-Konzentration, die Primer-Konzentration, die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen bestimmt.

Die Sequenzen der jeweiligen Primer sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Mittels der öffentlichen Datenbank *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) wurden alle Primer auf ihre Komplementarität zu den Zielgenen überprüft und die Länge des zu erwartenden Amplicons in Basenpaaren (bp) errechnet. Die verwendeten Primer wurden nach unseren Vorgaben bei der Firma IBA (Göttingen, Deutschland) synthetisiert und HPLC-gereinigt.

Details über die jeweiligen PCR-Bedingungen sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: PCR Konditionen

Gen	Primer-Anlagerung		Elongation		Zyklen Anzahl	Primer pmol
	T (°C)	Dauer (s)	T (°C)	Dauer (s)		
<i>β-Aktin</i>	60	30	72	30	30	100
<i>wnt 2</i>	62	60	72	120	32	50
<i>wnt 3</i>	60	60	72	90	35	100
<i>wnt 5a</i>	52	60	72	90	35	50
<i>wnt 7b</i>	58	60	72	90	35	100
<i>wnt 10b</i>	50	60	72	40	35	100

Gen	Primer-Anlagerung		Elongation		Zyklen Anzahl	Primer pmol
	T (°C)	Dauer (s)	T (°C)	Dauer (s)		
<i>wnt 13</i>	59	60	72	90	35	50
<i>fz 2</i>	61	60	72	60	39	50
<i>fz 6</i>	60	60	72	90	30	100
<i>lrp 6</i>	60	60	72	90	35	100
<i>dkk-1</i>	60	60	72	90	30	100
<i>β-catenin</i>	62	60	72	120	32	100
<i>cyclin D1</i>	55	60	72	90	37	100
<i>mmp7</i>	60	60	72	90	30	100
<i>c-myc</i>	62	60	72	90	37	100
<i>c-jun</i>	64	60	72	90	37	100

2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

2.2.8.1 Reagenzien

6x Probenpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
100bp-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10x TBE-Puffer	108 g Tris, 9,3 g EDTA, 55 g Borat Aqua bidest ad 1 l, Einstellen des pH auf 8,0 mit HCl

2.2.8.2 Durchführung

Das PCR-Amplifikat wurde in einem Agarosegel zur Beurteilung aufgetrennt (Sambrook et al. 1989). Der verwendete TBE-Puffer enthält EDTA, da dieses zweiwertige Kationen komplexiert und dadurch kationenabhängige Desoxyribonukleasen inaktiviert.

Je nach Molekulargewicht der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1 %ige Agarosegele für Plasmid-DNA und 1,5 - 2 %ige Gele für PCR-Produkte verwendet. Die eingewogene Agarosemenge wurde zum Lösen zusammen mit 1x TBE-Laufpuffer im Mikrowellenherd aufgekocht. Hierbei ist es günstig, das Erwärmen kurzzeitig zu unterbrechen, die Lösung aus dem Mikrowellenherd zu nehmen, leicht zu schwenken und anschließend das Erwärmen fortzusetzen. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50°C wurden 2,5 µg Ethidiumbromid je 100 ml zugesetzt, um die sp elektrophoretisch aufgetrennten und im Gel enthaltenen DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Die Lösung wurde in einen abgeklebten 50 ml Gelschlitten gegossen und ein Gelkamm (8 bzw. wahlweise 12 Kammzinken) eingesetzt. Das Gel erstarrt innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.2: Sequenzen und Amplifikationslängen (in bp) der verwendeten Primer

Gen	Primer	Sequenz	Amplifikat (bp)	Quelle
<i>β-Aktin</i>	sense	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	838	(Hagemann et al. 2004)
	antisense	5'-CGTCATACCTCTGCTTGTGCTGATCCACATCTTGC-3'		
<i>wnt-2</i>	sense	5'-CATGGTGGTACATGAGAGCTAC-3'	290	(Katoh 2001)
	antisense	5'-GGCAAAATACAATCCAGCTGAG-3'		
<i>wnt-3</i>	sense	5'-TGAACAAGCACAACAACGAG-3'	439	(Tulac et al. 2003)
	antisense	5'-CAGTGGCATTTTCTTCC-3'		
<i>wnt-5a</i>	sense	5'-ACACCTCTTCCAAACAGGCC-3'	347	(Sen et al. 2000)
	antisense	5'-GGATTGTTAAACTCAACTCTC-3'		
<i>wnt-7b</i>	sense	5'-GTTACGGCATCGACTTCTCC-3'	374	(Pukrop et al. 2006)
	antisense	5'-GTCTCTCCGCGAGTAGTTGG-3'		
<i>wnt-10b</i>	sense	5'-GAATGCCAATCCACAACAACA-3'	196	(Sen et al. 2000)
	antisense	5'-TTGCGGTTGGGTATCAATGAA-3'		
<i>Wnt-13</i>	sense	5'-AAGATGGTGCCAACTCACCG-3'	321	(Sen et al. 2000)
	antisense	5'-CTGCCCTTGGGGCTTTGC-3'		
<i>fz2</i>	sense	5'-CTAGCGCCGCTTCTGTTACCTG-3'	387	(Sen et al. 2000)
	antisense	5'-CAGCGTCTGCCCGACCAGATCCA-3'		
<i>fz6</i>	sense	5'-AGTCTTCAGCGGCTTGTATCTTGT-3'	561	(Tulac et al. 2003)
	antisense	5'-GCTCCGTCGGCTTTCACCTCT-3'		
<i>lrp 6</i>	sense	5'-CATCCTCGTCTTCACTCATC-3'	550	(Tulac et al. 2003)
	antisense	5'-GGCTCGAGTCTGTCTCTGCT-3'		
<i>dkk1</i>	sense	5'-CATCAGACTGTGCTCAGGA-3'	145	(Tulac et al. 2003)
	antisense	5'-CCACAGTAACAACGCTGGAA-3'		
<i>β-catenin</i>	sense	5'-GAAAATCCAGCGTGGACAAT-3'	423	(Holland et al. 2001)
	antisense	5'-TGCATGTTTCAGCATCTGTG-3'		
<i>c-jun</i>	sense	5'-GGATCAAGGGGAGAGGAAAG-3'	222	(Holland et al. 2001)
	antisense	5'-GCGTAGCATGAGTTGGCAC-3'		
<i>c-myc</i>	sense	5'-AGACTCCAGCCCTTCTCTCCG-3'	246	(Holland et al. 2001)
	antisense	5'-CTGTGAGGAGTTTGTGTGGCC-3'		
<i>cyclin d1</i>	sense	5'-TCTAAGATGAAGGAGACCATC-3'	354	(Holland et al. 2001)
	antisense	5'-GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTT-3'		
<i>mmp7</i>	sense	5'-AACTCCCGGTCATAGAAAATATG-3'	441	(Holland et al. 2001)
	antisense	5'-ACCCAAAGAAATGGCCAAAGTTTCATG-3'		

Die Menge der aufgetragenen DNA sollte idealerweise zwischen 0,1 und 1 µg liegen, das maximale Auftragsvolumen betrug bei den verwendeten Kämmen 15 µl pro Geltasche. Das Molekulargewicht der Amplifikate konnte mit Hilfe einer 100 bp-Leiter abgeschätzt werden. Dazu wurden 2,5 µl des entsprechenden primären PCR-Arkers mit Probenpuffer vermischt. Die PCR-Amplifikate wurden im Verhältnis 5:1 in Probenpuffer gelöst.

Während der Probenvorbereitung wurde der Kamm und der Gelstopper bzw. die Abklebung aus der Apparatur entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Zum Einpipettieren der Proben wurde jeweils eine frische Pipettenspitze verwendet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über zunächst 15 min bei 60 V gefolgt von 1 h bei 90 Volt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm betrachtet. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer CCD-Kamera als TIFF-Datei unter Verwendung der Software GDS in der Version 3 (Intas, Göttingen, Deutschland).

2.2.9 cDNA-Arrays

2.2.9.1 Vorbemerkung

Die verwendeten cDNA-Arrays der Firma Superarray beruhen auf dem Prinzip der Hybridisierung der markierten cDNA mit ihren - auf einer Membran fixierten - komplementären, genspezifischen Fragmenten. Die Markierung der cDNA erfolgt während der reversen Transkription der mRNA durch den Einsatz von biotinyliertem dUTP. Gebundene cDNA wird durch Streptavidin, das mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, visualisiert. Aufgrund der hohen Spezifität und Stabilität der nichtkovalenten Biotin-Streptavidin-Bindung erhält man ein klares Signal bei geringem Hintergrund (Vgl. 2.2.13.5).

Durch den Einsatz von cDNA-Hybridisierungs-Arrays wurde die simultane Analyse von Genexpressionsprofilen über eine relativ große Anzahl von Genen möglich. Der GEArray Q Series Human Wnt Signaling Pathway Gene Array enthielt 96 für den Wnt-Signalweg spezifische Gensonden, sowie Kontroll- und Haushaltsgene. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 2.2 wiedergegeben.

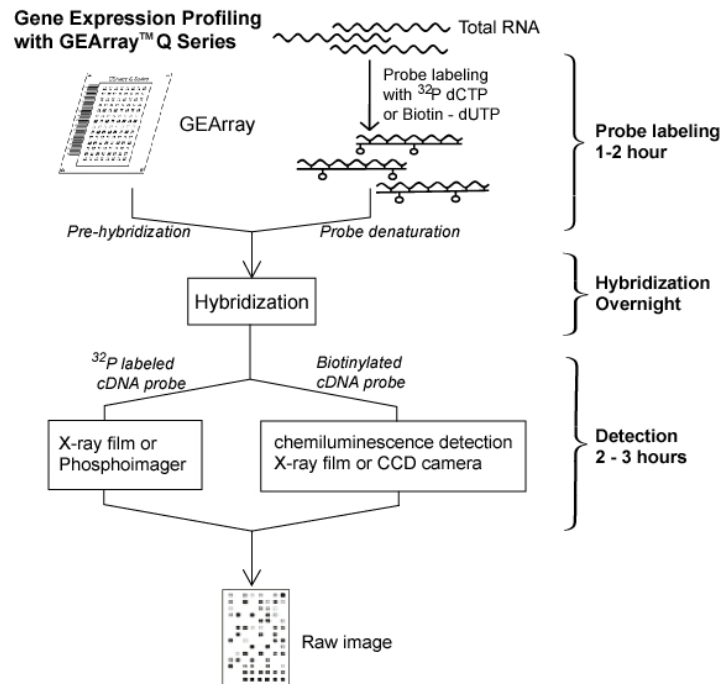


Abbildung 2.2: Übersicht über das Prinzip des cDNA-GEArray (www.superarray.com)

2.2.9.2 Reagenzien

GEArray “Q Series Human Wnt Biomol, Hamburg, Deutschland

Signaling Pathway Gene Array”

(HS-043)

GEAhyb-Lösung

im Kit enthalten

Puffer F

im Kit enthalten

GEAblocking-Lösung

im Kit enthalten

20x SSC

175,3 g NaCl und 88,2g Natriumcitratdihydrat in 900ml H_2O lösen, pH 7,0 mit 1M HCl einstellen, auf 1 l mit H_2O auffüllen

20% SDS

200 g Natriumdodecylsulfat (SDS) in 1 L H_2O lösen, zum Lösen auf 65°C erhitzen

Waschlösung 1

100ml 20x SSC und 50 mL 20% SDS auf 1 H_2O

Waschlösung 2

5 ml 20X SSC und 25 ml 20% SDS per auf 1 l H_2O

10x Formaldehyd-Gelpuffer

200 mM 3-[N-Morpholino-]Propansulfonsäure (MOPS)

50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen

1x Formaldehyd-Laufpuffer

100 ml 10x Formaldehyd-Gelpuffer, 20 ml 37% Formaldehyd auf 880 ml RNase-freies H_2O

2.2.9.3 RNA-Isolation

Die Isolation der benötigten RNA erfolgte wie unter 2.2.5.4 beschrieben mittels des RNeasy-Kits. Es wurde nur RNA von ausreichender Konzentration ($> 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Reinheit ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) eingesetzt. Zusätzlich wurden zur Qualitätssicherung alle RNA-Isolate mittels eines denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Geles aufgetrennt. In diesem Gel mussten sich, entsprechend den 28S und 18S Untereinheiten der ribosomalen RNA, zwei scharfe Banden mit einem Intensitätsverhältnis von 2:1 zeigen. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, erfolgte eine Weiterverwendung der Proben.

Die folgenden Arbeitsschritte der Reversen Transkription, Hybridisierung der Proben mit der Array-Membran und der Chemolumineszenzdetektion erfolgten alle entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

2.2.9.4 Herstellung der markierten cDNA

Zunächst wurde aus dem dem Reverse Transkription-Puffer durch Zugabe von 1 M Dithiothreitol-(DTT)-Lösung und dNTPs der benötigte Puffer BN hergestellt:

Puffer BN: 50 μl RT-Puffer
 1 μl 1 M DTT
 50 μl dNTP Mix: 5 mM dATP, dGTP, dCTP, *Cave!* 0,5 mM dTTP

Dabei betrug die Konzentration des eingesetzten Nukleotids dTTP $1/10$ der übrigen Nukleotide, da bei der anschließenden reversen Transkription Biotin-16-dUTP zugesetzt wurde.

RT-Mastermix:	Reagenz	Konzentration im Gesamtansatz
4 μl	Puffer BN	
2 μl	Biotin-16-dUTP	2 mM
2 μl	RNase-freies H ₂ O	
1 μl	RNase-Inhibitor	
1 μl	Reverse Transkriptase	(50 units/ μl)

Je 7,5 μg RNA der zu untersuchenden Proben wurde folgender Annealing Mix hergestellt:

Annealing-Mix: 7,5 μg Gesamt-RNA
 3 μg Puffer A
 ad 10 μl RNase-freies H₂O

Dieses Reaktionsgemisch wurde, nach sorgfältigem Mischen, kurz an zentrifugiert und im auf 70°C vorgeheizten Thermozykler für 3 min denaturiert, danach auf die für die reverse Transkription notwendige Temperatur von 42°C abgekühlt. 10 μl des ebenfalls auf 42°C erwärmten RT-Mixes wurden zu dem Annealing-Mix hinzupipettiert. Die reverse Transkription der RNA erfolgt anschließend durch Inkubation des Gemisches über 90 min bei 42°C. Besondere Bedeutung kam dabei dem vom Hersteller gelieferten Puffer A zu – dieser enthielt die Gen-spezifischen Primer für die reverse Transkription. Durch Erhitzen der Probe auf 92°C am Ende der Reaktion wurde die Probe denaturiert und die reverse Transkription beendet. Ein Einfrieren der Proben bei -20°C zur späteren Weiterverarbeitung war zu diesem Zeitpunkt möglich.

2.2.9.5 Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung der Membran war ein Blockierungsschritt zur Verringerung des Hintergrundsignals notwendig. Dazu wurde aus 1 ml der auf 60°C erhitzten GEHyb-Lösung durch Zugabe von 100 µg denaturierter, gescherter Lachs-Hoden-DNA Blockierungslösung hergestellt. Pro Hybridisierungsröhrchen wurden 2 ml dieser Blockierungslösung hinzugegeben und die Membran dann im Hybridisierungsöfen für 1 – 2 h bei 60°C mit einer Rotation von 5 - 10 RPM inkubiert.

Die entsprechend 2.2.9.4 hergestellte Sonden-cDNA wurde in 750µl GEHyb-Lösung mit einer Temperatur von 60°C gelöst. Nach dem Verwerfen der Blockierungslösung wurde dieses Gemisch dem Hybridisierungsröhrchen hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte anschließend mit einer Rotation von 5 - 10 RPM bei 60°C über 12 h.

Nach Beendigung der Hybridisierung erfolgten vier 15minütige Waschröschritte mit 60°C warmer Waschlösung 1, gefolgt von zwei 15minütigen Waschröschungen mit 60°C warmer Waschlösung 2.

2.2.9.6 Chemolumineszenzdetektion

Vor Zugabe des 1:8000 in 1x Puffer F verdünnten mit Peroxidase markierten Streptavidins wurde die Membran durch 40 min Inkubation mit der GEAblocking-Lösung geblockt. Die Inkubationszeit mit dem AP-Streptavidin betrug 10 min. Anschließend wurde die Membran wiederholt mit 1x Puffer F gewaschen, gefolgt von zwei Waschröschritten mit dem Puffer G.

Zur Chemolumineszenzdetektion wurden je Hybridisierungszylinder 1 ml CDP-Star-Chemolumineszenz-Substrat hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wurde in einer Filmkassette ein Photofilm mit der Membran belichtet.

Auf der Membran befanden sich neben den Negativkontrollen *pUC18* und den Leerkontrollen auch die Haushaltsgene *β-Aktin* und *GADPH*. Anhand dieser Signale erfolgte eine qualitative Auswertung der untersuchten Transkripte. Dazu wurden die entwickelten Filme eingescannt und als TIFF-Datei gespeichert.

2.2.10 Plasmid-Herstellung und Transfektion

2.2.10.1 Reagenzien

LB-Agar:	Invitrogen Europe, Paisly, United Kingdom
imMedia Amp Agar	
LB-Medium:	Invitrogen Europe, Paisly, United Kingdom
imMedia Amp Liquid	
SOC-Medium	Invitrogen Europe, Paisly, United Kingdom
EndoFree Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
	(enthält die unten aufgeführten Puffer P1, P2, P3, ER, QBT, QC, QN und Endotoxin-freien Tris-EDTA (TE) Puffer sowie

den QIAfilter-Filter und die Qiagen-tip-Säule)

2.2.10.2 Bakterienkultur

Als Ausgangsmaterial für die Transformation wurde der kompetente, d.h. transformierbare *E. coli*-Stamm TOP-5 verwendet.

Die verwendeten Plasmide pBAT- Δ HMG, pBAT- Δ β -Catenin und pCS2 (Behrens et al. 1996) sowie die Plasmide Super8xTOPFlash und Super8xFOPFlash (Korinek et al. 1997; Veeman et al. 2003) wurden freundlicherweise von Dr. Dietmar Gradl (Universität Karlsruhe, Zoologisches Institut II) zur Verfügung gestellt. Zur Selektion enthalten die aufgeführten Plasmide das *amp* Gen, welches eine β -Lactamase kodiert und somit die Ampicillinresistenz der transformierten Bakterienklone vermittelt.

Für die Anzucht von Bakterien wurde das vorgefertigte, sterile Medium imMedia Amp Liquid entsprechend den Anweisungen des Herstellers in H₂O gelöst und anschließend in der Mikrowelle erhitzt. Entsprechend der auf den Plasmiden vorhandenen Antibiotikaresistenz enthielt das Medium 100 μ g/ml Ampicillin. Weiterhin wurden Ampicillin-haltige Agarplatten mit imMedia Amp Agar hergestellt. 10 ml der abgekühlten Lösung wurden für je eine 21,5-cm²-Petrischale verwendet. Nach dem Abkühlen der ausgegossenen Agarplatten wurden diese, um ein Austrocknen zu verhindern, möglichst luftdicht verpackt und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.10.3 Transformation

Die auf Filterpapier konservierten Plasmide wurden durch Zugabe von 50 μ l TE-Puffer (Vgl. 2.2.10.4) und Inkubation bei 55°C für 2 h zunächst eluiert. 5 μ l des Eluats wurden anschließend für die Transformation verwendet. Diese wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers nach dem Hitzeschockprotokoll (Hanahan 1983) durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten TOP-5-Stämme wurden zunächst auf Eis für 30 min aufgetaut. Zwischenzeitlich wurde ein Heizblock auf 42°C aufgeheizt. Nach Zugabe von 5 μ l des Eluats zu den aufgetauten *E. coli* wurde die Suspension für 30 min bei 4°C auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurde die Suspension dann für 45 s auf 42°C erwärmt und direkt im Anschluss erneut 2 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 900 μ l SOC-Medium wurden die Zellen resuspendiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Ein 10 μ l Aliquot der Suspension wurde danach mittels einer sterilen, gebogenen Glaspipette auf den Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Diese beimpften Agarplatten wurden kopfüber über Nacht bei 37°C inkubiert. Von je einer Einzelkolonie der transformierten Bakterien wurden dann 5ml Ampicillin-haltiger LB-Medium-Starterkulturen angelegt. Aliquots dieser Kulturen sind dann in Glycerolhaltigen (15 % v/v) Lösungen bei -20°C oder -70°C dauerhaft lagerbar.

2.2.10.4 Plasmidpräparation

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Qiagen EndoFree Midi Kit verwandt, womit Plasmide bis zu einer Größe von 150 kb aufgereinigt werden können. Mit dem Midi-Kit konnten Präparationen mit einer Ausbeute von 75-100 μ g Plasmid-DNA durchgeführt werden. Das Aufreinigungsprinzip beruht auf einer

modifizierten alkalischen Lyse, einer anschließenden Plasmidbindung an das Anionen-Austauscherharz bei niedriger Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert. RNA, Proteine und Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht werden durch die Waschvorgänge eliminiert. Die Plasmid-DNA wird durch eine hohe Salzkonzentration von dem Harz gelöst und durch eine Isopropanol-Fällung konzentriert und aufgereinigt. Die Startkultur wurde in 100 ml eines Ampicillin-haltigen LB-Medium-Ansatzes überführt und unter Agitation für 12 - 16 h inkubiert. Im Anschluss daran wurde diese Kultur 15 min bei 6000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer P1 des Plasmidaufreinigungs-Kits aufgenommen. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 des Kits wurde das Pellet vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei Raumtemperatur zur vollständigen Lyse 5 min inkubiert. Darauf wurde 10 ml gekühlter Puffer P3 des Kits dazugegeben, die Lösung sorgfältig gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten zellulären Proteine, Membranen und genomische DNA wurden durch Verwendung des QIAfilter-Systems gebunden. Zu dem Filtrat wurden 2,5 ml Puffer ER des Kits gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Qiagen-tip 500, die das Anionen-Austauscherharz enthaltende Säule, wurde in ein sauberes 50-ml-Röhrchen gestellt und mit 10 ml Puffer QBT aus dem Kit äquilibriert. Die Flüssigkeit sollte den Qiagen-tip der Schwerkraft folgend durchfließen (wie auch alle folgenden Flüssigkeiten). Danach wurde der gefilterte Überstand eingefüllt. Nun folgten zwei Waschvorgänge mit jeweils 30 ml Puffer QC des Kits. Die Eluierung der DNA wurde anschließend durch die hohe Salzkonzentration des zuzugebenen Puffers QN aus dem Kit erreicht. Die Fällung der DNA wurde, nach der Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und kräftigem Vortexen, durch Zentrifugation für 30 min bei 15.000 U/min und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und das Pellet nach 5-10 min Lufttrocknung in 75 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei -80°C zur Lagerung weggefroren. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte spektrometrisch anhand des OD_{260/280}-Quotienten wie im Abschnitt 2.2.5.5 beschrieben.

Zur Qualitätskontrolle der gewonnenen Plasmid-DNA wurden 2 µl des Eluates in einem 1 %igem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe auch 2.2.8). Ungeschnittene Plasmide erscheinen auf dem Gel als Banden scheinbar unterschiedlicher Größe. Superhelikale Plasmid-DNA, die den natürlichen Konformation intakter Plasmid-DNA darstellt, wandert schneller als ihre Größe erwarten läßt. Ursächlich dafür ist der durch das Supercoiling reduzierte räumliche Widerstand. Daneben zeigt sich die offene zirkuläre, d.h. entspannte Form in der entsprechenden Größe des Plasmids.

2.2.10.5 Transiente Transfektion

Zur Transfektion der MCF-7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden kam die Calcium-Phosphat-Präzipitation (Bacchetti und Graham 1977) unter Verwendung der CalPhos Mammalian Reagenzien (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) zum

Einsatz. Hierbei bindet die zu transfizierende DNA an ausfällende Calciumphosphatkristalle. Diese Suspension wird den adhärent wachsenden Zellen zugesetzt und nach Anhaftung an die Zellmembran durch Endozytose aufgenommen. Die inkorporierte DNA wird dann transient transkribiert, d.h. es kommt nur zu einer vorübergehenden Expression der kodierten Proteine, da keine Integration des Plasmides in das Genom der Zielzellen erfolgt.

Die MCF-7-Zellen wurden zunächst in 6-well-Zellkulturschalen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Nach circa 12 h Wachstum wurde eine für die Transfektion ideale Konfluenz des Zellrasens von 70 – 80 % erreicht. In Vorbereitung der Transfektion wurde zunächst das Zellkulturmedium gewechselt und die Transfektionslösungen vorbereitet:

Lösung A: 5 µg Plasmid DNA
12,4 µl 2 M Calcium-Lösung
ad 100 µl steriles dH₂O

Lösung B: 100 µl HBS

Unter kontinuierlichem, vorsichtigem Vortexen der Lösung B wurde die Lösung A tropfenweise hinzugegeben. Die entstandene Suspension wurde dann für 20 min bei RT inkubiert. Nach Resuspension der Calciumphosphat-DNA-Kristalle wurden je Napf 200 µl der Suspension tropfenweise den Zellkulturen hinzupipettiert. Durch behutsames Schwenken der Zellkulturschalen wurden die Kristalle gleichmäßig in der Kultur verteilt, im Anschluß erfolgte eine 5stündige Inkubation. Danach wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht und die Zellen über Nacht für weitere 12 h inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen lichtmikroskopisch bezüglich ihrer Vitalität und Morphologie evaluiert, anschließend wurden die transfizierten Zellen für die unter 2.2.4.3 beschriebenen Mikroinvasionsassays verwandt.

2.2.11 Luciferase-Reporter-Assays

In Zusammenarbeit mit Dr. Dietmar Gradl wurden MCF-7-Zellen mit dem Super8xTOPFlash Vektor, welcher in seiner Promotorregion multiple TCF/LEF-Bindungsstellen enthält (Korinek et al. 1997; Veeman et al. 2003), transient transfiziert (Vgl. 2.2.10.5). Durch diesen artifiziellen Promotor wird die Expression des aus dem Glühwürmchen stammenden Gens *luciferase* kontrolliert. Dessen Genprodukt setzt ATP-abhängig in Anwesenheit von Mg^{2+} und O_2 in einer als Biolumineszenz bezeichneten Reaktion das Substrat Luciferin unter Emission von sichtbarem Licht um. Daher korreliert die, mittels eines Luminometers bestimmte, emittierte Lichtmenge mit der transkriptionellen Aktivität am LEF1-Promoter des Vektors und damit mit der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges.

Als dazugehörige Negativkontrolle wurde der Super8xFOPFlash Vektor, dessen Promotorregion aufgrund gezielter Mutationen keine TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren mehr bindet, eingesetzt. Zur späteren Normalisierung wurde jeweils der Vektor

pCMV- β -gal (Clontech, Mountain View, CA, USA), welcher dank des Zytomegalievirus-(CMV)-Promotors eine konstitutive β -Galactosidase-Expression ermöglicht, kotransfiziert.

Nach 48 h unter den entsprechenden Versuchsbedingungen wurden die Zellen abtrypsinisiert und geerntet. Die Luciferase-Aktivität wurde mittels des kommerziell erhältlichen Kits Bright-Glo (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt und auf die durch das Kit Beta-Glo (Promega) ermittelte β -Galactosidase-Aktivität normalisiert.

2.2.12 Proteinextraktion

2.2.12.1 Reagenzien

Lyse-Puffer 250 mM Succrose, 5 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, pH auf 7,5 einstellen, steril filtrieren, vor Verwendung Zugabe von 3 μ l Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) je 1000 μ l Puffer

2.2.12.2 Zellyse und Homogenisation

Nach dem Verwerfen des Zellkulturmediums wurden die abtrypsinisierten Zellen in 5 ml eiskaltem PBS aufgenommen und für 10 min bei 1000U/min zentrifugiert. Das dekantierte Pellet wurde dann durch Zugabe von 50 – 100 μ l eiskaltem Lyse-Puffer lysiert. Zur vollständigen Lyse wurde das Gemisch sorgfältig resuspendiert und durch mindestens 10malige Aspiration mit einer 22 G Kanüle homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C mit 13.000 U/min für 20 min zentrifugiert.

2.2.12.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Protein erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) nach der Bicinchoninsäure-(BCA)-Methode (Smith PK et al. 1985). Diese beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in einem alkalischen Medium in der Anwesenheit von Proteinen. Das einwertige Cu^{1+} reagiert dann mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure zu einem stabilen, wasserlöslichen, violetten Chelatkomplex. Die Absorption dieses Komplexes bei einer Wellenlänge von 562 nm verhält sich nahezu linear zur Proteinmenge in der Probe. Anhand einer Standardkurve kann dann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Nach 10facher Verdünnung der Proben wurden Duplikate zu je 50 μ l parallel zu einer BSA-Verdünnungsreihe (0 – 600 μ g/ml in 100 μ g Schritten) mit 1 ml Working Solution (Lösung A : Lösung B des Kits in einem Verhältnis von 50 : 1) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 562 nm gegen H_2O als Leerwert. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mittels der berechneten Standardkurve.

2.2.13 Immunoblot

2.2.13.1 Vorbemerkung

Der sogenannte „Western Blot“ dient der Analyse von Proteingemischen zum Nachweis von Proteinen bekannter Größe und gliedert sich in 3 Arbeitsschritte. Zunächst erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine. Hierzu wird das Zelllysate in Anwesenheit eines reduzierenden Probenpuffers, der zudem ein anionisches Detergens enthält, denaturiert. Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der enthaltenen Proteine wird somit aufgehoben, d.h. Proteinkomplexe dissoziieren in ihre Untereinheiten und Proteine werden linearisiert. Durch das anionische Detergens erfolgt eine zum Gewicht des Proteins direkt proportionale Beladung der Proteine mit negativen Ladungskomplexen – die Eigenladung wird maskiert. Dies ermöglicht die Auftrennung der Proteine in einem hochmolekularen Gel nach ihrer Größe, proportional zur Laufstrecke im angelegten elektrischen Feld (Laemmli 1970). Marker mit bekanntem Molekulargewicht ermöglichen die Abschätzung der Proteingröße. Im zweiten Schritt werden die Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran transferiert, d.h. „geblottet“. Als letztes schließt sich der direkte Proteinnachweis an. Hierzu wird das Antigen mit einem spezifischem Antikörper angefärbt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten sekundären Antikörper, welcher mit Peroxidase markiert ist. Diese katalysiert die Oxidation des Chemolumineszenzfarbstoffes Luminol, das entstehende Signal wird über einen Röntgenfilm gemessen. Durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern ist so der Nachweis definierter Proteine und evt. ihres Phosphorylierungszustandes möglich.

2.2.13.2 Reagenzien

APS Lösung	100 µg Ammoniumpersulfat in 1 ml H ₂ O
SDS-Probenpuffer reduzierend (5fach konzentriert)	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, vor Gebrauch 15 % β-Mercaptoethanol frisch hinzugeben
Trenngelpuffer	181,7 g Tris, 20 g SDS in 1 l H ₂ O, pH 8,8 mit NaOH einstellen
Sammelgelpuffer	181,7 g Tris, 20 g SDS in 1 l H ₂ O, pH 6,8 mit HCl einstellen
10x Elektrophorese-Puffer	30 g Tris, 144 g Glycin in 800 ml H ₂ O lösen, 10 g SDS hinzugeben und auf 1 l auffüllen
1x Transfer-Puffer	5,82 g Tris, 2,93 g Glycin, 0,038 g SDS in 200 ml Methanol lösen, H ₂ O ad 1 l
Ponceau S	2 g Ponceau-Farbstoff in 1 l 5% Essigsäure
PBS-T	1 % (v/v) Tween 20 in PBS

Blockierungs-Puffer	5 % (w/v) Magermilchpulver, fettreduziert in PBS-T
Antikörper-Puffer	0,1 % (v/v) Tween 20, 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

2.2.13.3 Diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese

Nach der Proteinbestimmung wurden 20 – 40 µg Gesamtprotein in dem entsprechenden Volumen des 5fach konzentrierten Probenpuffers gelöst und zur Denaturation für 4 min auf 95°C in einem Heizblock erhitzt. Zwischenzeitlich wurde das SDS-Polyacrylamidgel, welches aus dem Trenn- und dem darauf geschichteten Sammelgel besteht vorbereitet. Für das Sammelgel wurde folgende Rezeptur befolgt:

30% Acrylamid-Lsg.	ml	1,8
Sammelgelpuffer	ml	3,5
H ₂ O	ml	9,4
APS-Lsg.	µl	25
TEMED	µl	150

Der saure Sammelgelpuffer und die geringere Vernetzung des Polyacrylamids bewirken eine Konzentration der Probe zu einer scharfen Bande vor Eintritt in das Trenngel. Je nach Größe des zu untersuchenden Zielproteins wurde die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels zur Erhöhung der Auflösung entsprechend angepasst:

MW (kDa)		25 - 60	20 - 70	40 - 100
Acrylamid %		12,5	10	8
30% Acrylamid-Lsg.	ml	15,0	13,0	9,6
Trenngelpuffer	ml	10,0	10,0	10,0
H ₂ O	ml	15,0	17,0	20,4
APS-Lsg.	µl	270	270	270
TEMED	µl	70	70	70

Das bei Raumtemperatur nach Zugabe von APS und TEMED als Initiatoren der Polymerisation ausgehärtete Gel wurde in den vertikalen Elektrophoreseapparat eingespannt und dieser mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach sorgsamem Ausspülen der Geltaschen wurde mittels einer Hamilton-Pipette das Gel bestückt. Die Elektrophorese wurde initial mit einer Spannung von 90 Volt gestartet. Waren die Proben aus den Taschen ausgewandert, wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese bis zum sichtbaren Durchlaufen der Commassie-Front des Probenpuffers fortgesetzt.

2.2.13.4 Proteintransfer

Zum Elektroblotten wurden die Gele in ein „Sandwich“ aus Blotting-Papier (Schleicher und Schüll, Dassel) und der Nitrozellulose-Membran Hybond-C Extra (Amersham, München, Deutschland) mit folgender Schichtung überführt:

Anode

2 Schichten Filterpapier (Dicke 0,9 mm)
1 Schicht Filterpapier (Dicke 0,35 mm)
Nitrocellulose
Trenngel
1 Schicht Filterpapier (Dicke 0,35 mm)
2 Schichten Filterpapier (Dicke 0,9 mm)

Kathode

Zur Äquilibration wurde das Trenngel für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Nach Entfernung aller Luftblasen durch Ausrollen mit einer Pipette wurde das Sandwich in den Transferapparat eingesetzt. Mit der nach der Formel:

$$\text{Spannung (mA)} = \text{Fläche der Membran in cm}^2 \times 1,8$$

berechneten Spannung wurden die Gele für 60 min geblottet. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Membran anschließend unter sanftem Schwenken mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Der Farbstoff Ponceau-Rot bindet reversibel an Proteine und ist durch H₂O leicht entfernbar. Nach diesem Waschschritt wurde die Nitrozellulosemembran unter sanfter Agitation bei Raumtemperatur für 1 h in Blockierungs-Puffer zur Absättigung der Proteinbindungskapazität der Membran geblockt. Somit wurde in den folgenden Schritten die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran reduziert.

2.2.13.5 Immunfärbung

Im Anschluss an die Blockierung, wurde die Membran mit dem primären Antikörper gelöst in Antikörper-Puffer über 12 h bei 4°C unter kontinuierlicher Agitation inkubiert. Zum Proteinnachweis wurden die folgenden primären Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

Antigen	Verdünnung	Spezies	Hersteller
β-Aktin	1:2000	Maus	Chemicon
β-Catenin gesamt	1:1500	Maus	Santa Cruz Biotechnology
β-Catenin phosphoryliert	1:1500	Maus	Alexis
E-Cadherin	1:1000	Ziege	Transduction Laboratories
PKC gesamt	1:750	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
PKC phosphoryliert	1:500	Kaninchen	Cell Signaling Technology

Nach gründlicher Entfernung des primären Antikörpers durch drei 5minütige Waschungen mit PBS-T, wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit den speziesspezifischen, mit Meerrettich-Peroxidase markierten Sekundärantikörpern, welche ebenfalls im Antikörper-Puffer gelöst wurden, inkubiert.

Antigen	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Maus IgG	1:2000	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen IgG	1:2000	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Ziege IgG	1:2000	Esel	R&D

Der Nachweis der immunologisch markierten Proteine erfolgte dann mit dem *enhanced chemiluminescence*-Kit (ECL-Kit, Amersham, Piscataway, NJ, USA). Hierzu wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers die Detektionsreagenzien zu gleichen Teilen miteinander gemischt und die zuvor mit PBS-T gewaschene Membran in dieser Lösung für 30 – 60 s geschwenkt. Im Anschluß wurde mit einer Expositionsdauer von wenigen Sekunden bis Minuten durch die lumineszierende Membran ein Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham) belichtet.

2.2.14 Immunfluoreszenzfärbung

2.2.14.1 Vorbemerkung

Analog dem Immunoblot erfolgt auch in der Immunfluoreszenzfärbung der Nachweis eines bestimmten Proteins durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern. Der entscheidende Unterschied liegt jedoch im Probenmaterial – anstelle eines Zelllysats wird das Antigen in fixierten Zellen dargestellt. Dies ermöglicht neben dem reinen Nachweis auch Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation des Antigens. Funktionelle Zusammenhänge werden somit offenbar.

Die Immunfluoreszenzfärbung gliedert sich in verschiedene Arbeitsschritte. Zunächst wird das Antigen durch den primären Antikörper erkannt, an diesen bindet dann der sekundäre, mit einem Fluorochrom markierte Antikörper. Zur Begutachtung des Gewebes ist abschließend eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI möglich (Vgl 2.2.4.3).

2.2.14.2 Reagenzien

Antikörper-Puffer	0,1 % (v/v) Tween 20, 1 % (w/v) BSA in PBS
primärer Antikörper	anti-Wnt-5a, Ziege-IgG, R&D Systems
sekundärer Antikörper	anti Ziege-IgG, Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-konjugierter Maus IgG, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
50x DAPI Lösung	4',6-Diamidino-2-phenylindol zu 5 mg/ml in PBS lösen
Mowiol-Eindeckmedium	Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland

2.2.14.3 Durchführung

In Abhängigkeit der zu untersuchenden Zellen wurden entweder Makrophagen oder MCF-7-Zellen in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Um die anschließende Immunfluoreszenzfärbung zu ermöglichen, wurden in die einzelnen Näpfe sterile

12 mm-Deckgläschen eingesetzt, auf deren Oberfläche die adhären Zellen anwachsen. Das weitere Procedere entsprach den unter 2.2.4.2 geschilderten Bedingungen.

Zur Fixierung der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium aspiriert und verworfen, die Zellen behutsam dreimal mit warmen PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 4 % (v/v) 37°C warmen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA wurde durch drei Waschschrte mit PBS entfernt und im Anschluß die Zellmembranen der fixierten Zellen durch 10 min Inkubation in warmer Triton X-Lösung aufgeschlossen. Daran schlossen sich erneute Waschschrte mit PBS an. Die Deckgläschen mit den darauf fixierten Zellen wurden nun aus den Schalen herausgenommen und invertiert, d.h. mit dem Zellrasen nach unten, in einem 40 µl-Tropfen der primären Antikörper-Lösung über Nacht inkubiert. Nach Aspiration der Antikörper-Lösung wurden die Plättchen vorsichtig in einer 24-well-Platte wiederholt schwimmend gespült. Die gewaschenen Deckgläschen wurden dann wie oben beschrieben für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser war mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Zur Verringerung des Ausbleichens des Fluoreszenzfarbstoffes geschah dieser und alle folgenden Arbeitsschrte soweit möglich in einer lichtdichten Kammer oder unter lichtreduzierten Bedingungen. Zur Kerngegenfärbung wurden die Zellen, nach drei Waschschrten, mit 1x DAPI-Lösung für 5 min bei RT gefärbt. Mit dem Eindeckmedium Mowiol wurden die invertierten Glasplättchen auf herkömmlichen Objektträgern eingebettet. Nach Aushärten des Mowioles konnten die Präparate dann im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

2.2.14.4 Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an dem Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland). Zur Dokumentation wurde die CCD Kamera AxioCam MRM (Zeiss) benutzt. Bearbeitet und gespeichert wurden die Bilder mit der Software Axiovision Version 3.1 (Zeiss).

Für die Fluoreszenzmikroskopie kam für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (Zeiss) als Lichtquelle zum Einsatz. Dabei wurden für DAPI (Exzitation bei 358 nm, Emission 463 nm) die Filter 365 nm als Anregungsfilter und 525 nm als Emissionsfilter verwendet. Für die FITC-markierten sekundären Antikörper (Exzitation bei 494 nm, Emission 521 nm) wurden die Filter 480/40 nm als Anregungsfilter und 535/50 nm als Emissionsfilter eingesetzt.

2.2.15 MTT-Test

2.2.15.1 Reagenzien

MTT-Lyse-Puffer 75% (v/v) Ameisensäure, 25% (v/v) DMSO

MTT-Reagenz 5 mg/ml

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid

2.2.15.2 Durchführung

Dieser kolorimetrische Test beruht auf dem Umsatz des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) über das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu einem wasserunlöslichen Formazanfarbstoff (Mosmann 1983). Da der Farbstoff nur von vitalen Zellen umgesetzt wird, ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Menge der vitalen Zellen. Für den Test wurden in Triplikaten je 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach 20 – 24 h unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen wurde zu allen Näpfen 100 μ l der MTT-Stammlösung hinzugefügt. Es fand dann eine weitere Inkubation der Zellen für 4 h statt. Danach wurde das MTT-Medium aspiriert und verworfen. Die Zellen wurden in dem Ameisensäure-haltigen Lysepuffer lysiert, gemischt und in eine 96-Loch-Platte überführt. In einem Plattenphotometer wurde bei 562 nm nun die Absorption bestimmt. Die Mittelwerte der Extinktionen aus den Dreifachansätzen wurden ins Verhältnis zu den Messwerten der Kontrolle gesetzt.

2.2.16 Zymographie

2.2.16.1 Vorbemerkung

Die Zymographie stellt eine einfache, jedoch sehr sensitive Methode (Kleiner und Stetler-Stevenson 1994) zur Detektion von Matrixmetalloproteasen dar. Dazu werden die Proben durch in einen nicht-reduzierendem Puffer aufgenommen und durch die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (Vgl. 2.2.13.1). Die Auftrennung erfolgt in einem Gel, welches neben Polyacrylamid, das jeweils spezifische Substrat (zum Beispiel Gelatine oder β -Casein) der zu untersuchenden MMPs enthält (Heussen und Dowdle 1980). Nach der Elektrophorese erfolgt durch Auswaschen des SDS durch das nichtionische Detergens Tween eine Renaturierung und durch Inkubation im Entwicklungspuffer eine Aktivierung der aufgetrennten MMPs. Dies betrifft auch vorhandene Vorstufen, die pro-MMPs (Springman et al. 1990) oder durch Inhibitoren besetzte MMPs (Kleiner und Stetler-Stevenson 1994), da durch die Elektrophorese eine Dissoziation des Inhibitors vom Enzym stattfindet. Somit korreliert die Zymographie mit der Gesamtmenge aller in der Probe enthaltenen MMPs. Die Visualisierung dieser Menge erfolgt durch Anfärben des Geles mit Coomassie-Blau. Dabei stellen sich die MMPs durch ihre proteolytische Aktivität als helle Bande gegen den blau gefärbten Hintergrund unverdauten Substrates dar.

2.2.16.2 Reagenzien

Gelatin-Agarose-beads	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS
5x Probenpuffer	0,04% Bromphenolblau, 6,3% (w/v) Tris-HCl, 20% (v/v) Glycerol, 5% (w/v) SDS in Aqua bidest
Laufpuffer	0,3% (w/v) Tris-HCl, 1,44% (w/v) Glycerin, 0,1% SDS in

	Aqua bidest., pH 8.6
Renaturierungspuffer	2.5% (v/v) Triton X-100 in Aqua bidest.
Entwicklungspuffer	0,6% (w/v) Tris-Base, 1,17% (w/v) NaCl, 0,056% CaCl ₂ in Aqua bidest., pH 7,5 0.067% (v/v) Brij-35 hinzugeben
Färbelösung	0.5%. (w/v) Coomassie-Blau, 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in Aqua bidest.
Entfärbelösung	30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in Aqua bidest
Fixierlösung	30% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Glycerol in Aqua bidest.

2.2.16.3 Durchführung

Da das dem Kulturmedium zugesetzte FCS reich an Gelatine-spezifischen MMPs, d.h. Gelatinasen, ist, wurde vor Beginn der Versuche das zu verwendende FCS MMP depletiert. Dazu wurden die Gelatine-Agarose-beads (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zweimal in sterilem PBS gewaschen und eine Mischung aus gleichen Anteilen beads und PBS hergestellt. 100 µl dieser Suspension wurden 10 ml FCS zugesetzt und für 1 h bei 4°C auf einem Rolltisch inkubiert. Nach Pelletierung der beads wurde der Prozess zweimal mit dem Überstand wiederholt. Das Gelatinase-depletierte FCS wurde anschließend steril filtriert. Zur Kontrolle der Effektivität der Gelatinase-Depletion wurde das Serum mittels Zymographie auf die Abwesenheit signifikanter MMP-Mengen untersucht.

Analog dem Immunoblot wurden zunächst die SDS-Polyacrylamid-Gele bestehend aus Sammel- und Trenngel gegossen (Vgl. 2.2.13.3). Da sich die untersuchten MMPs in ihrem Molekulargewicht und ihrem Substrat unterscheiden, wurde bei der Herstellung der Gele folgendes beachtet:

	MMP-2	MMP-9	MMP-3	MMP-7
MW (kDa)				
pro-MMP	72	92	54	28
MMP	62	82	45	20
Substrat	1,5 mg/ml Gelatin		0,5 mg/ml β-Casein	
% PA-Gel	8%		10%	

Vor dem Ernten und Lysieren der Zellen mittels Zymographie-Lysepuffer wurde der Kulturmediumüberstand abgenommen. Durch den BCA-Assay wurde die Proteinkonzentration sowohl der lysierten Zellen als auch des Überstandes bestimmt. Zu je 20 µg Protein wurde konzentrierter Probenpuffer hinzugefügt und die Proben in den Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Gel-Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 130 V durchgeführt, bis die Coomassie-Blau-Front des Probenpuffers aus dem Trenngel herausgelaufen war (circa 150 min). Anschließend wurden die Gele für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch in 100 ml Renaturierungspuffer

inkubiert und dann mehrfach je 1 min in Aqua bidest. gewaschen. Es folgte eine 30minütige Äquilibrierung der Gele bei RT in 100 ml Entwicklungspuffer. Nach einem Wechsel des Entwicklungspuffers wurden die Gelatine-Gele 24 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Zur Erhöhung der Sensitivität des Assays betrug die Inkubationszeit der β -Casein-Gele 36 h.

Durch Schwenken der Gele für 3 h in der Färbelösung wurden die inkubierten Gele zunächst gefärbt. Für die Darstellung der MMP-Banden wurden die Gele anschließend unter Sicht für circa je 1 min, 15 min, 30 min und 60 min entfärbt. Die Entfärbelösung wurde dabei zwischen jedem Schritt gewechselt. Abschließend wurden die Gele 15 min in Fixierlösung inkubiert und zwischen zwei Blättchen Zellophanfolie (Invitrogen) in einem Rahmen (Geldry-Frame, Invitrogen) luftgetrocknet.

Zur qualitativen Analyse wurden die Zymographie-Gele mittels des Flachbettscanners Aficio 161 MP (Ricoh) eingescannt und im TIFF-Dateiformat gespeichert.

2.2.17 Statistische Auswertung

Zur Analyse der Relationen zwischen verschiedenen Invasionsraten wurden die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen (σ) berechnet. Mittels des Student-t-Test wurde unter Annahme unterschiedlicher Varianz der Stichproben mit dem Tabellenkalkulations-Programm Excel 2000 für Windows (Microsoft Corporation, USA) die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kalkuliert. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse erfolgte mit Excel 2000 und mit Hilfe des Grafik-Programms Sigma Plot für Windows (Version 10.0, Jandel Corporation, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse mittels RT-PCR und cDNA-Arrays

3.1.1 Nachweis vermehrter Wnt-5a-mRNA-Expression in Makrophagen nach Ko-Kultur mittels RT-PCR

Zunächst wurde aus MCF-7-Zellen und Makrophagen sowohl unter Ko-Kulturbedingungen als auch aus Einzelkulturen Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann zur Herstellung von Amplifikaten mittels der PCR eingesetzt. Die eingesetzten Primer und Fragmentlängen der PCR Produkte sind in der Tabelle 2.2 angegeben. Die etablierten PCR-Protokolle zeigten eine konstante Replizierbarkeit. Als Positivkontrolle für Wnt-2, Wnt-3, Wnt-5a, Wnt-7a, LRP-6, Fz2, Fz6, Dkk1 und β -catenin, wurde Gesamt-RNA aus humaner Plazenta verwendet (Tulac et al. 2003), welche freundlicherweise von der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinikums Göttingen zur Verfügung gestellt wurde. Zusammenfassend ergab sich auf mRNA-Ebene in der qualitativen PCR das in der Tabelle 3.1 aufgeführte Expressionsmuster.

Während sich in allen untersuchten mRNAs kein Unterschied zwischen Einzelkultur und Ko-Kultur zeigte, wurde Wnt-5a in den Makrophagen in Ko-Kultur eindeutig exprimiert, während es in der Einzelkultur kaum detektierbar war (Abbildung 3.1).

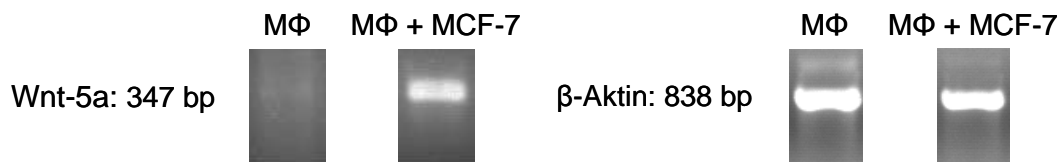


Abbildung 3.1: Wnt-5a mRNA-Expression in Makrophagen (MΦ), sowie MΦ in Ko-Kultur mit MCF-7 (MΦ + MCF-7); repräsentative semiquantitative PCR

Dieses Ergebnis war in wiederholten Ko-Kulturversuchen ($n > 3$) mit Makrophagen aus unterschiedlichen Primärmaterial, d.h. verschiedenen Spendern, reproduzierbar.

3.1.2 Identifizierung weiterer Wnt-Komponenten mittels cDNA Arrays

Zur weiteren Analyse der mRNA Expression wurde erneut RNA aus MCF-7-Zellen und Makrophagen in Einzelkultur, und aus Ko-Kulturversuchen isoliert. Nach Überprüfung der Reinheit der Gesamt-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese, d.h. einer scharfen Abgrenzung der 18S und 28S rRNA Banden, wurde die Gesamt-RNA unter Verwendung von biotinyliertem UTP in cDNA umgeschrieben und mit den GEArray-Membranen hybridisiert. Die Darstellung der hybridisierten cDNA-Sonden erfolgte mittels der beschriebenen Chemolumineszenzreaktion.

Tabelle 3.1: mRNA-Expression von Wnt-Liganden, -Rezeptoren, -Inhibitoren und Zielgenen des Signalweges in der RT-PCR

	Wnts						Rezeptoren			Inhibitoren	Signaltransduktion	Zielgene		
	Wnt-2	Wnt-5a	Wnt-7b	Wnt10b	Wnt-13	Fz 2	Fz 6	LRP 6	Dkk1	β -Catenin	Cyclin D1	c-jun	c-myc	MMP 7
MCF-7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MCF-7 + M Φ	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M Φ	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
M Φ +MCF-7	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabelle 3.2: mRNA-Expression von Wnt-Liganden,- Rezeptoren, -Inhibitoren und Zielgenen des Signalweges im GEArray

	Rezeptoren						Signaltransduktion		
	Fz 1	Fz 5	Fz 7	Fz 8	LRP 5	GSK-3 β	APC	Axin	
MCF-7	+		+		+	+	+	+	
MCF-7 + M Φ	+		+		+	+	+	+	

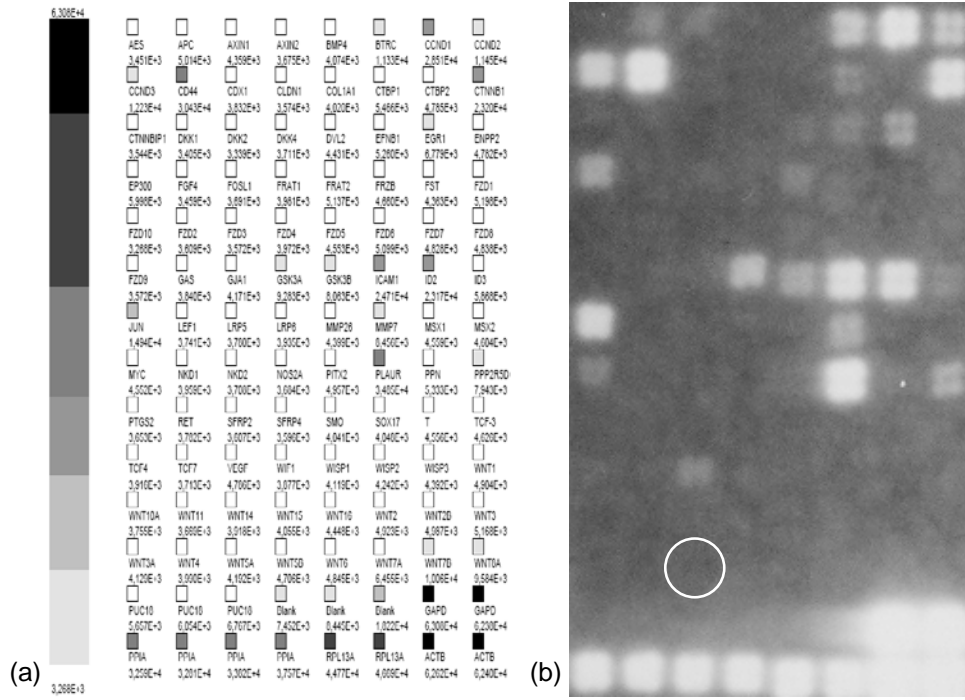


Abbildung 3.2: GEArray von Makrophagen in Einzelkultur (a) Auswertung mit GEArray Analyzer, integrated density value (IDV) der jeweiligen Spots, unter Angabe des Gen-Symbol, normalisiert auf Mittelwert der Signalintensitäten, nach Subtraktion des Leerwerts (b) Original-Array, durch Kreis Wnt-5a-Spot hervorgehoben

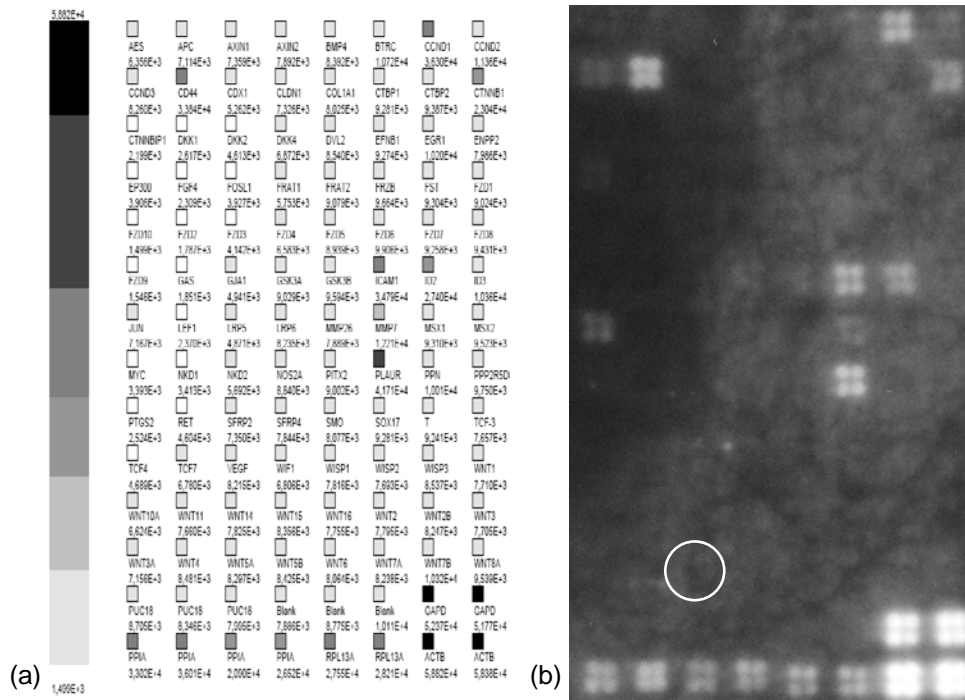


Abbildung 3.3: GEArray von Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7 (a) Auswertung mit GEArray Analyzer, normalisierter IDV (b) Original-Array, durch Kreis Wnt-5a-Spot hervorgehoben

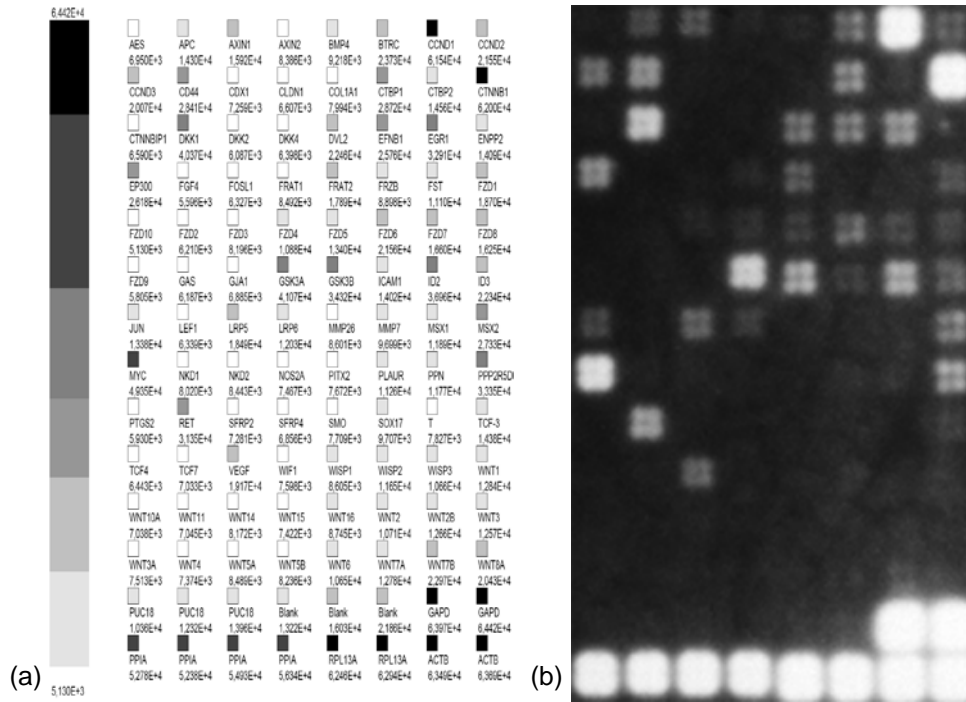


Abbildung 3.4: GEArray von MCF-7 in Einzelkultur (a) Auswertung mit GEArray Analyzer, normalisierter IDV (b) Original-Array

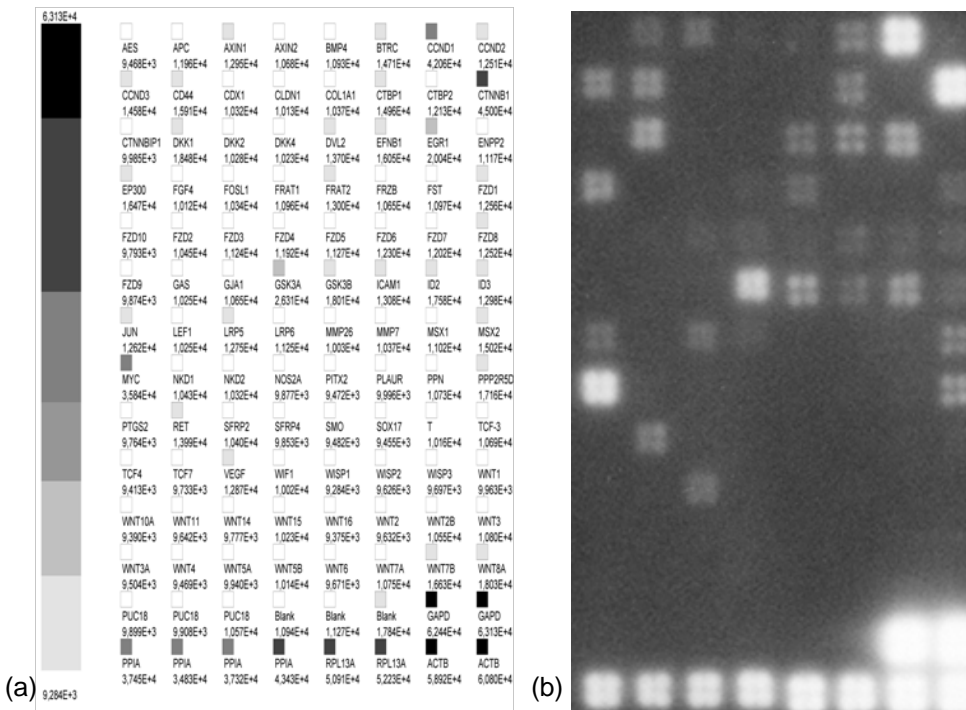


Abbildung 3.5: GEArray MCF-7 in Ko-Kultur mit Makrophagen (a) Auswertung GEArray Analyzer, normalisierter IDV (b) Original-Array

Zur Auswertung der Arrays wurden diese eingescannt, mittels der Software Scanalyze in der Version 2.51 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) digitalisiert und mit der von Superarray zur Verfügung gestellten Software GEArray Analyzer (<http://www.superarray.com>) quantifiziert.

Nach Subtraktion des Hintergrundes und Normierung der Signale auf den Median aller Signalintensitäten der Membran mittels der oben genannten Software wurden die Expressionmuster analysiert. Es wurde dabei zunächst die Genexpression der Makrophagen in Einzelkultur und in Ko-Kultur mit MCF-7 betrachtet. Es zeigten sich in den verwendeten cDNA-Hybridisierungsarrays keine signifikanten Unterschiede der Genexpression im Vergleich zwischen Einzel- und Ko-Kulturbedingungen (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3).

Auch in den MCF-7-Zellen konnten keine differentielle Expression zwischen Einzelkultur und Ko-Kultur mit Makrophagen dargestellt werden (siehe Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5).

Über die bereits durch die PCR detektierten Gene hinaus, zeigte die Array-Analyse jedoch die Expression zahlreicher weiterer Mitglieder des Wnt-Signalweges. Somit konnte das in der PCR gefundene Expressionsmuster erweitert werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst.

3.2 In-vitro-Invasionsversuche

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Ko-Kultur von niedrigmalignen Mammakarzinomzelllinien mit Makrophagen zu einer gesteigerten Invasivität der Tumorzellen führt (Hagemann et al. 2004). Zur Überprüfung, ob die gesteigerte Wnt-5a-Expression der Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7 einen biologischen Effekt widerspiegelt, wurden in-vitro-Invasionsversuche in der Boyden-Kammer mit MCF-7-Zellen in Einzelkulturen und Ko-Kulturen mit Makrophagen durchgeführt. Hierbei wurde die alleinige Ko-Kultur als Kontrolle gegenüber den übrigen Versuchsbedingungen verwandt und die gemessene Invasion auf diese Kontrolle normalisiert. Parallel wurden Zytospins der Zellen durchgeführt und mit DAPI angefärbt.

3.2.1 Dkk1 inhibiert die Makrophagen-induzierte Invasivität

Mit der Zielsetzung, die biologische Wirkung, der in der RT-PCR gezeigten, verstärkten Expression von Wnt-5a in den Makrophagen, näher zu untersuchen, wurden zunächst in-vitro-Invasionsassays mit Zugabe des physiologischen Wnt-Inhibitors Dkk1 als humanes, rekombinantes Protein in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Ko-Kultur von Tumorzellen und Makrophagen ohne Dkk1 wurde jeweils auf 100 % normalisiert (Tabelle 3.3), um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Kammern zu ermöglichen.

Tabelle 3.3: repräsentativer in-vitro-Invasionsassay von MCF-7-Zellen in Einzelkultur, Ko-Kultur mit Makrophagen, Ko-Kultur und dem Wnt-Antagonist Dkk1, migrierte Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt

Ko-Kultur + Dkk1 ng/ml	MCF-7								
	-	+ MΦ							
	0	0	5	12,5	25	0	50	100	250
Boyden-Kammer	Kammer 1					Kammer 2			
migrierte Zellen absolut (x 10 ³)	5	51	42	29	12	21	3	0	3
	3	55	44	23	7	19	2	1	2
	1	49	48	24	8	17	3	0	0
	2	50	52	29	13	22	1	2	2
	3								
Mittelwert	2,8	51,25	46,5	26,25	10	19,75	2,25	0,75	1,75
Standardabweichung	1,48	2,63	4,43	3,20	2,94	2,22	0,96	0,96	1,26
Prozent	5%	100%	91%	51%	20%	100%	11%	4%	9%
σ in %	3%	5%	9%	6%	6%	11%	5%	5%	6%

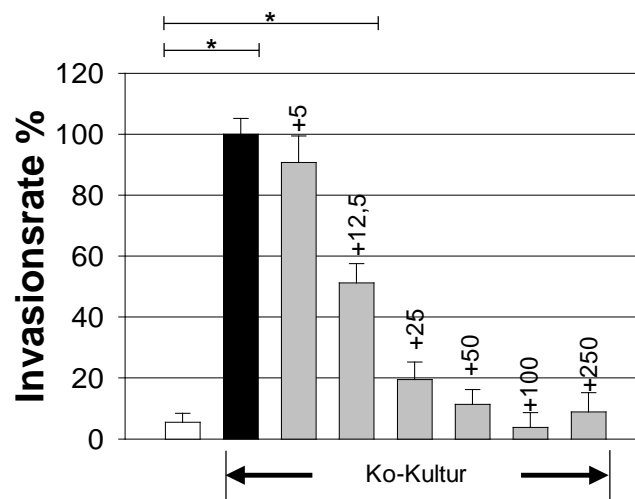


Abbildung 3.6: repräsentativer in-vitro-Invasionsassay von MCF-7-Zellen (weiße Säule), in Ko-Kultur mit Makrophagen (schwarze Säule), in Ko-Kultur mit Makrophagen in Anwesenheit von Dkk1 (graue Säulen) in der angegebenen Konzentration (ng/ml), (Mittelwerte, ± Standardabweichung), * = p < 0.05

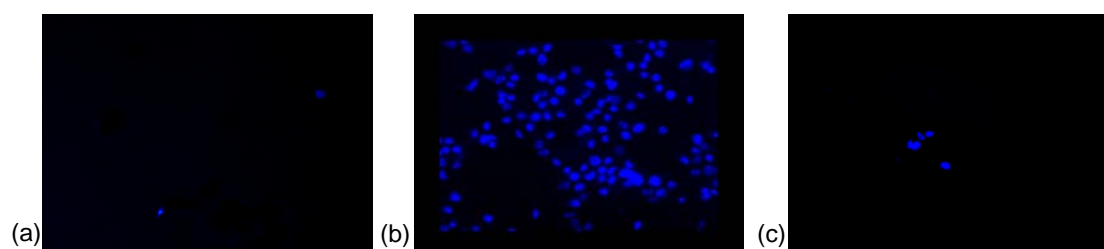


Abbildung 3.7: DAPI-Färbung invadierter MCF-7-Zellen, repräsentative Gesichtsfelder, Vergrößerung 10x (a) MCF-7 Einzelkultur (b) MCF-7 in Ko-Kultur mit Makrophagen (c) MCF-7-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen + Dkk1 50 ng/ml

Die Zugabe des rekombinanten Dkk1 zeigt in den Ko-Kulturversuchen eine deutliche Inhibition der Invasionsaktivität der MCF-7-Zellen (Tabelle 3.3). Dieser Effekt ist deutlich dosisabhängig und flacht ab einer Konzentration von 50 ng/ml ab.

3.2.2 Wnt-5a stimuliert die Invasivität von Tumorzellen

Um die Wirkung von Wnt-5a in Ko-Kulturbedingungen zu replizieren, wurden mit MCF-7-Einzelkulturen Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt, in denen den Kammern rekombinantes, murines Wnt-5a in verschiedenen Konzentration zugesetzt wurde. Zudem wurden Versuche durchgeführt, in denen neben Wnt-5a auch der Antagonist Dkk1 hinzugegeben wurde (Tabelle 3.4). Zur Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen, wurde die nach Zugabe von 100 ng/ml Wnt-5a gemessene Invasivität herangezogen und auf 100 % gesetzt.

Tabelle 3.4: repräsentativer in-vitro-Invasionsassay von MCF-7-Zellen in Einzelkultur, Ko-Kultur mit Makrophagen, Einzelkultur und dem Wnt-Agonist Wnt-5a, Einzelkultur mit sowohl Wnt-5a als auch Dkk1, migrierte Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt

Ko-Kultur	MCF-7							
	-	+ MΦ	-					
	+ Wnt-5a ng/ml	-	50	100	250	500	100	100
+ Dkk1 ng/ml	-	-						50
Boyden-Kammer	Kammer 1						Kammer 2	
migrierte Zellen absolut (x 10 ³)	3	18	8	19	20	21	15	8
	2	15	10	15	18	22	16	10
	3	19	12	18	21	20	13	8
	3	18	11	16	20	20	16	8
		14						
Mittelwert	2,75	16,80	10,25	17,00	19,75	20,75	15,00	8,50
Standardabweichung	0,50	2,17	1,71	1,83	1,26	0,96	1,41	1,00
Prozent	16%	99%	60%	100%	116%	122%	100%	57%
σ in %	3%	13%	10%	11%	7%	6%	9%	7%

Wie aus Tabelle 3.4 und Abbildung 3.8 hervorgeht, zeigte sich in dieser Versuchsanordnung, dass der Ko-Kultur-Effekt durch Zugabe von rekombinantem Wnt-5a alleine imitierbar war. Die Steigerung der Invasivität durch Wnt-5a ist dosisabhängig und kann durch die Anwesenheit des Antagonisten Dkk1 inhibiert, aber nicht komplett aufgehoben werden.

3.2.3 In-vitro-Invasionsversuche transfizierter Tumorzellen

In den geschilderten in-vitro-Invasionsversuchen wurde eine inhibierende Wirkung durch den Antagonisten des kanonischen Signalweges Dkk1 gefunden. Der inhibitorische Effekt Dkk1 erreichte jedoch nicht das basale Niveau der Ko-Kultur (Vgl. 3.2.1) Daraus ergab sich die Hypothese, dass eine intrinsische Grundaktivität des kanonischen Signalweges, welche durch Dkk1 nicht inhibierbar ist, für die Invasion von MCF-7-Zellen in Ko-Kulturbedingungen notwendig ist. Daher wurden zunächst funktionelle in-vitro-Invasionsversuche durchgeführt.

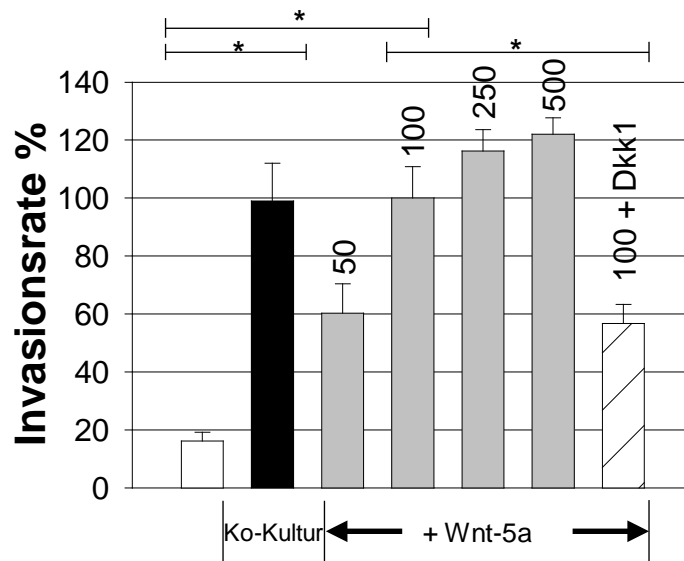


Abbildung 3.8: In-vitro-Invasionsassay von MCF-7-Zellen (weiße Säule), in Ko-Kultur mit Makrophagen (schwarze Säule), + Wnt-5a (graue Säulen) in der angegebenen Konzentration (ng/ml), + Wnt-5a (100 ng/ml) + Dkk1 (50 ng/ml) (schraffierte Säule), (Mittelwerte, \pm Standardabweichung), * = $p < 0.05$

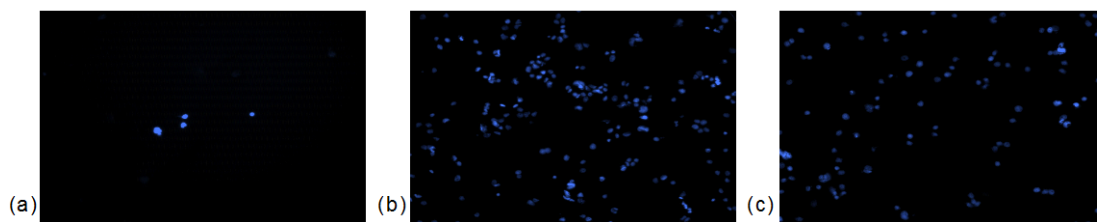


Abbildung 3.9: DAPI-Färbung invadierter MCF-7-Zellen, repräsentative Gesichtsfelder, Vergrößerung 10x (a) MCF-7 Einzelkultur (b) MCF-7 + Wnt-5a 100 ng/ml (c) MCF-7-Zellen + Wnt-5a 100 ng/ml + rDkk1 50 ng/ml

Hierzu kamen dominant negative pBAT-LEF-1-Konstrukte (Behrens et al. 1996) zum Einsatz. Das Plasmid pBAT-LEF-1- Δ HMG exprimiert ein LEF-1-Protein mit fehlender HMG-Domäne, welche die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors LEF-1 vermittelt. Somit wird eine Aktivierung der Transkription trotz aktiviertem LEF-1 unterbunden. Durch das komplementäre Plasmid pBAT-LEF-1- Δ β -Cat wird LEF-1 ohne die N-terminale, β -Catenin-bindende Domäne exprimiert. Dadurch verhindert dieses Plasmid eine Interaktion zwischen unphosphoryliertem β -Catenin und LEF-1. Hieraus resultiert ebenfalls eine fehlende Aktivierung der Transkription. Als Kontrolle wurden MCF-7 transient mit dem Leerplasmid pCS2 transfiziert.

Zur Auswertung wurden die invadierten Zellen ausgezählt und die absoluten Werte auf die Ko-Kultur als Bezugspunkt normalisiert.

Beide dominant negativen LEF-1-Konstrukte führen zu einer Abnahme der Makrophagen-induzierten Invasion. Dabei war der inhibitorische Effekt durch die

fehlende Bindung von β -Catenin an LEF-1 stärker als der Δ HMG-LEF-1-Konstruktes. Ein funktionaler β -Catenin-Signalweg ist demzufolge eine notwendige Voraussetzung für die Invasionszunahme der Tumorzellen in Ko-Kulturbedingungen.

Eine weiterführende Analyse der intrazellulären Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalweges mittels Immunoblot wurde durch diese Ergebnisse notwendig (Vgl. 3.43.4.1).

Tabelle 3.5: repräsentativer in-vitro-Invasionsassay transfizierter MCF-7-Zellen in Einzelkultur und Ko-Kultur mit Makrophagen, migrierte Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt

Ko-kultur	MCF-7			
	-	+ M Φ		
Plasmid	pCS2		pBAT- Δ HMG	pBAT- Δ β -Cat
migrierte Zellen absolut (x 10 ³)	3	18	12	8
	4	16	12	9
	3	20	14	9
	3	17	14	8
MW	3,25	17,75	13,00	8,50
Standardabweichung	0,50	1,71	1,15	0,58
Prozent	18,31%	100,00%	73,24%	47,89%
σ in %	3%	10%	6%	3%

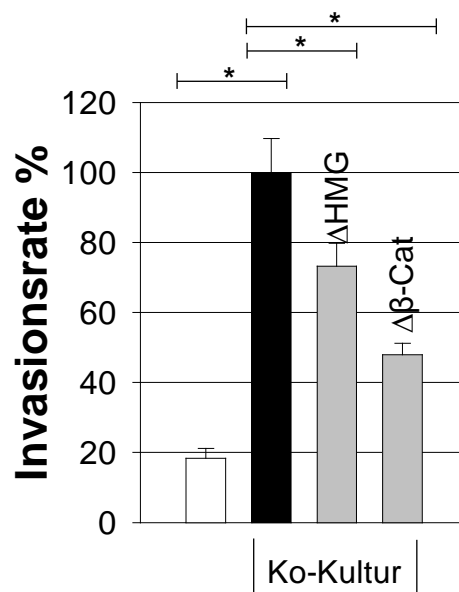


Abbildung 3.10: in-vitro-Invasionsassay von pCS2-MCF-7-Zellen (weiße Säule), in Ko-Kultur mit Makrophagen (schwarze Säule), pBAT- Δ HMG- und pBAT- Δ β -Catenin-MCF-7 in Ko-Kultur (graue Säulen)

3.3 MTT-Assay

Zur Klärung der Frage ob die durch Dkk1-vermittelte verminderte Invasivität der Tumorzellen auf einer Beeinträchtigung der Viabilität beruht, wurden sowohl MCF-7-Zellen als auch Makrophagen mit 50 ng/ml Dkk1 für 24 h inkubiert. Anschließend

wurde der Farbstoff MTT hinzugefügt, die Zellen lysiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Resultate wurden nach Abzug des Leerwertes auf die jeweilige Kontrolle normalisiert.

3.3.1 Dkk1 bewirkt im MTT-Test keine Abnahme der Viabilität

Tabelle 3.6: Einfluss von Dkk1 auf den MTT-Umsatz, Mittelwert (MW)

	MW (n=4)	σ	Prozent	σ in %
Makrophagen Kontrolle	0,163	0,016	100,00%	9,64%
Makrophagen + 50 ng Dkk1	0,170	0,046	104,45%	26,77%
MCF-7 Kontrolle	0,640	0,078	100,00%	12,21%
MCF-7 + 50 ng Dkk1	0,663	0,075	103,60%	11,38%

Es konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Antagonist in den eingesetzten Zellen nicht zu einer Abnahme der mitochondrialen, metabolischen Aktivität der in den Ko-Kulturversuchen verwendeten Zellen führt. Die invasionshemmende Wirkung von Dkk1 beruht damit nicht auf einer Viabilitätsminderung von Tumorzellen oder Makrophagen.

3.4 Immunoblots

Nachdem in der RT-PCR die Hochregulation von Wnt-5a in der Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen gezeigt werden konnte, wurde mittels eines Immunoblots die Wirkung des von den Makrophagen in Ko-Kultur sezernierten Wnt-5a auf die Tumorzellen untersucht. Zunächst standen die Auswirkungen auf den kanonischen, d.h. über β -Catenin-vermittelten, Signalweg im Vordergrund.

3.4.1 Fehlende Regulation von β -Catenin und E-Cadherin in der Ko-Kultur

Es wurden MCF-7-Zellen erneut in Ko-Kultur mit Makrophagen gebracht. Aus diesen Zellen wurde nach 1 h, 4 h, 16 h und 40h Protein extrahiert. 40 μ g des Proteinlysats wurden durch SDS-PAGE-Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen Gesamt- β -Catenin (Molekulargewicht 94 kD), unphosphoryliertes β -Catenin (MW 94 kD) und E-Cadherin (MW 120 kD) inkubiert. Für die initialen Immunoblots wurde ein Zelllysats aus der Kolonkarzinomzelllinie SW-480 als Positivkontrolle verwendet. Aufgrund einer Mutation des *apc* Genes (Nishisho et al. 1991) ist in dieser Zelllinie der kanonische Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert und die intrazelluläre Konzentration an unphosphoryliertem β -Catenin in diesen Zellen erhöht.

Es zeigte sich auf Proteinebene keine Veränderung der intrazellulären Gesamtmenge an β -Catenin über den untersuchten Zeitraum der Ko-Kultur. Weiterhin kommt es auch zu keiner Zunahme an unphosphoryliertem β -Catenin (Vgl. Abbildung 3.11). Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges ließ sich somit im Immunoblot nicht darstellen. Jedoch ist unter allen experimentellen Bedingungen eine basale Menge unphosphorylierten β -Catenins detektierbar.

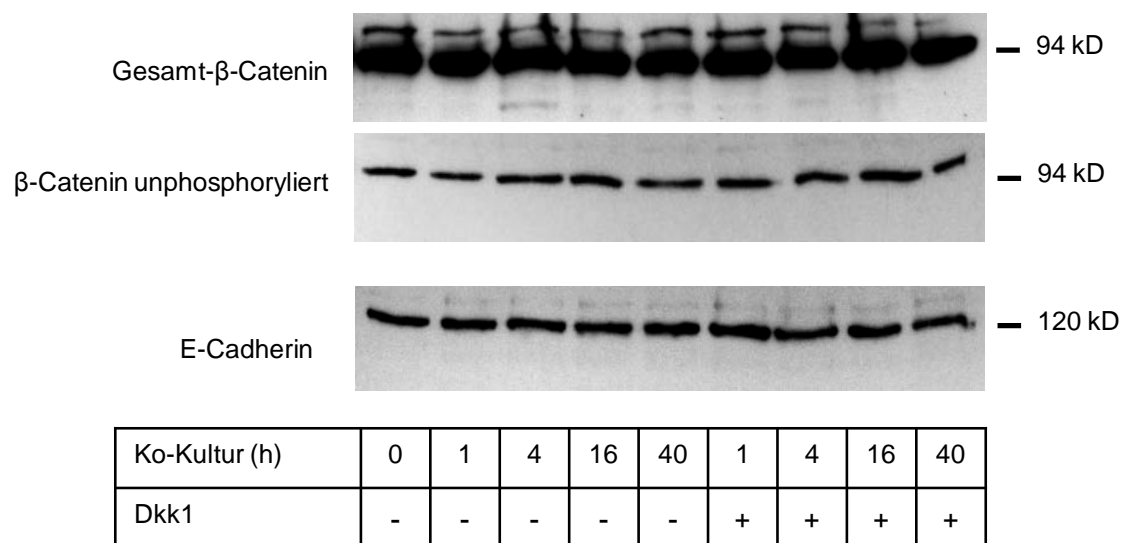


Abbildung 3.11: MCF-7 in Ko-Kultur mit Makrophagen, Immunoblot gegen β -Catenin (gesamt und unphosphoryliert) und E-Cadherin

Außerdem führte die Ko-Kultur der beiden Zelltypen nicht zu einer Veränderung der Menge des intrazellulären E-Cadherins. Als klassisches Cadherin kann E-Cadherin, durch Bindung des intrazellulären β -Catenins und Integration in das Zytoskelett, die Menge des für das kanonische Wnt-Signaling zur Verfügung stehenden β -Catenins beeinflussen (Nelson und Nusse 2004). Eine Umverteilung des β -Catenin-Pools findet somit aufgrund der ausbleibenden E-Cadherin-Regulation ebenfalls nicht statt.

Der Einsatz des Wnt-Inhibitors Dkk1 in einer Konzentration von 50 ng/ml führte zu keiner Abnahme des unphosphorylierten β -Catenins in den MCF-7-Zellen in Ko-Kultur mit Makrophagen. Diese Konzentration zeigte in den in-vitro-Invasionsassays jedoch eine deutliche Supprimierung der durch Ko-Kultur mit Makrophagen verursachten Invasivität.

Somit ist weder die Makrophagen-induzierte Invasionssteigerung noch deren Inhibition durch Dkk1 durch eine Änderung der Menge aktiven β -Catenins bedingt.

3.4.2 Wnt-5a führt in MCF-7 zu keiner Aktivierung der PKC

Zur Analyse ob Wnt-5a in den MCF-7-Zellen zu einer Aktivierung nichtkanonischer Wnt-Signalwege führt, wurden weiterführend die mögliche Aktivierung der PKC als Ziel des Wnt/ Ca^{2+} -Signalweges untersucht.

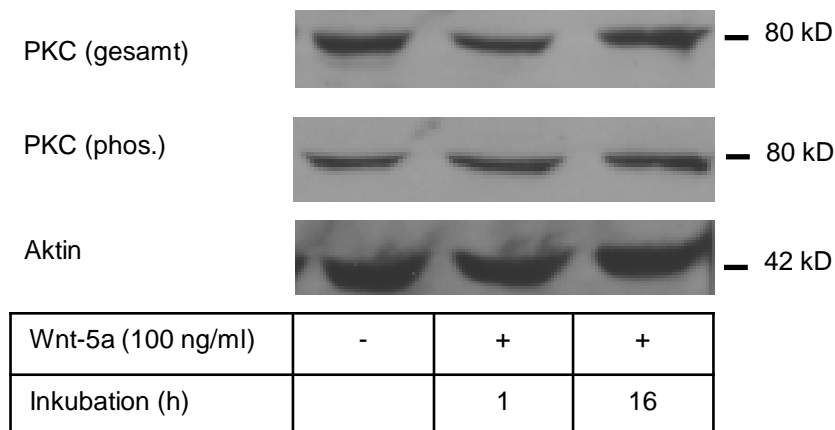


Abbildung 3.12 MCF-7 stimuliert mit rekombinatem Wnt-5a (100 ng/ml), PKC-Immunoblot gegen PKC (gesamt und phosphoryliert)

MCF-7-Zellen wurden, ausgehend von den Ergebnissen der Wnt-5a-induzierten Invasionssteigerung, mit rekombinatem Wnt-5a in einer Konzentration von 100 ng/ml für 1 h oder 16 h stimuliert. 40 µg des gewonnenen Proteinlysats wurden einem Immunoblot gegen Gesamt-PKC, phosphorylierter PKC und Aktin unterzogen.

Unter diesen Bedingungen konnte sowohl für die PKC-Gesamtmenge als auch für den phosphorylierte PKC-Anteil keine Regulation durch Wnt-5a gezeigt werden. Folglich ist in den MCF-7, nicht von einer Aktivierung des Wnt/Ca²⁺-Signalweges auszugehen.

3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Da im Immunoblot unter Ko-Kulturbedingungen oder Dkk1 weder eine Veränderung der Gesamt-β-Catenin-Menge noch des unphosphorylierten β-Catenins beobachtet werden konnte, war von einer fehlenden Aktivierung des kanonischen Signalweges auszugehen. Zur Validierung dieser Hypothese wurde die intrazelluläre Lokalisation von β-Catenin weiter untersucht.

3.5.1 Keine Veränderung der zellulären Lokalisation β-Catenins in MCF-7-Zellen in der Ko-Kultur

Es wurden MCF-7-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und in Ko-Kultur mit Makrophagen gebracht. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung des intrazellulären Gesamt-β-Catenins. Zur Validierung der Immunfluoreszenzfärbung wurden zudem als Positivkontrolle MCF-7-Zellen nach Zugabe des GSK-3β-Inhibitors LiCl in einer Konzentration von 3 mM angefärbt, diese Färbung zeigte, neben einer deutlichen zytoplasmatischen Färbung, eine teilweise nukleäre Lokalisation des β-Catenins.

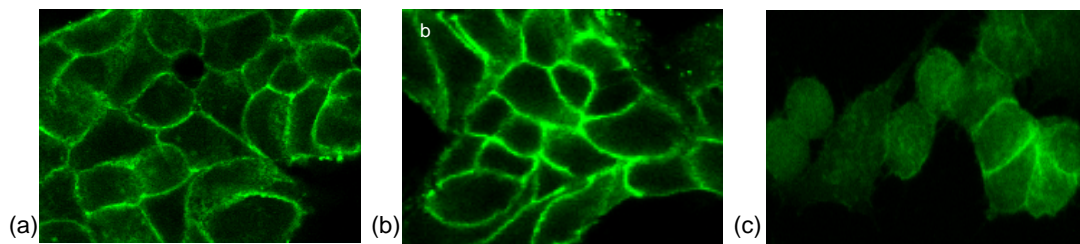


Abbildung 3.13: Immunfluoreszenzfärbung gegen Gesamt- β -Catenin, Vergrößerung 63x (a) MCF-7 in Einzelkultur (b) MCF-7 in Ko-Kultur mit Makrophagen (c) unter 3 mM LiCl

In den durchgeführten Experimenten konnte keine Translokation des β -Catenins in den Zellkern nach Ko-Kultur der MCF-7-Zellen mit Makrophagen gezeigt werden (Abbildung 3.13). Vielmehr blieb β -Catenin weiterhin membranständig lokalisiert. Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in MCF-7-Zellen nach Ko-Kultur mit Makrophagen findet, in Einklang mit den Ergebnissen des β -Catenin-Immunoblots, demnach nicht statt.

3.5.2 Wnt-5a-Proteinexpression wird in Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7 hochreguliert

In den RT-PCR Versuchen wurde eine verstärkte Wnt-5a-Expression der Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen gezeigt. Durch den Einsatz der Immunfluoreszenzfärbung wurde der Nachweis einer damit einhergehenden verstärkten Proteinexpression angestrebt. Makrophagen wurden dazu auf Deckplättchen ausgesät und für 20 h in Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte MCF-7-Zellen benutzt.

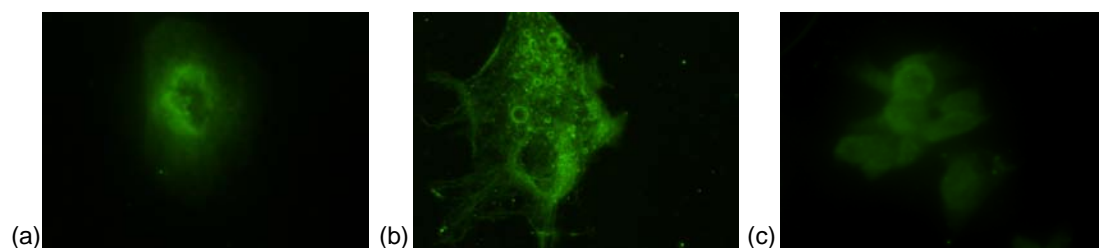


Abbildung 3.14: Immunfluoreszenzfärbung gegen Wnt-5a, Vergrößerung 63x (a) Makrophagen Einzelkultur (b) Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7 (c) naive MCF-7

Wie in Abbildung 3.14 ersichtlich zeigte diese Versuchsanordnung eine deutliche Zunahme des intrazellulären Wnt-5a in den Makrophagen. Die MCF-7-Zellen zeigen dagegen ein nur unspezifisches Signal.

3.6 Reporterassays

In den Mikroinvasionsassays konnte, wie oben geschildert, gezeigt werden, dass rekombinantes Wnt-5a analog der Ko-Kultur zu einer gesteigerten Invasivität der Tumorzellen führt (Vgl. 3.2.2). Durch die Immunoblots gegen β -Catenin konnte weiterhin etabliert werden, dass in der Ko-Kultur dieser Effekt nicht durch eine Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges verursacht wird (Vgl. 3.4.1). Der direkte Einfluss von Wnt-5a auf das Wnt-Signaling in den Tumorzellen bedurfte jedoch noch weiterer Klärung, insbesondere da eine Wnt-5a-abhängige mögliche Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges postuliert wird (Topol et al. 2003).

3.6.1 Wnt-5a beeinflusst in MCF-7-Zellen nicht den kanonischen Wnt-Signalweg

Zunächst wurden MCF-7-Zellen transient mit dem Super8xTOPFlash-Reporterkonstrukt transfiziert. Die transfizierten MCF-7-Zellen wurden mit Wnt-5a oder Dkk1 bzw. simultan mit beiden rekombinanten Proteinen stimuliert. Als interne Positivkontrollen dienten einerseits Wnt-8, andererseits LiCl in einer Konzentration von 3 mM. Beide Substanzen sind bekannte Aktivoren des kanonischen Wnt-Signalweges. Als entsprechende Negativkontrolle wurde der Super8xFOPFlash-Vektor, dessen Promotorregion aufgrund gezielter Mutationen keine TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren mehr bindet (Korinek et al. 1997), eingesetzt. Die Resultate dieser Negativkontrolle sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen. Zur Normalisierung wurde jeweils der Vektor pCMV- β -gal kotransfiziert. Dieser besitzt bedingt durch seinen CMV-Promotor eine konstitutive β -Galactosidase-Expression.

Tabelle 3.7: SuperFOP-Aktivität (n=3-6, Mittelwerte \pm Standardfehler)

	SuperFOP-Aktivität %
MCF-7	100,0 \pm 14,7
MCF-7 + 50 ng/ml Dkk1	106,6 \pm 3,7
MCF-7 + 100 ng/ml Wnt-5a	101,2 \pm 2,4
MCF-7 + Wnt-8	116,7 \pm 3,5
MCF-7 + 3 mM LiCl	98,4 \pm 5,9

Wie in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.15 ersichtlich findet durch rekombinantes Wnt-5a weder eine Aktivierung noch eine Hemmung des kanonischen Signalweges statt. Auch die zusätzliche Zugabe von rekombinanten Dkk1 hat bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wnt-5a keinen signifikanten Einfluss auf diesen Signalweg in den Tumorzellen.

Dadurch werden, wenn auch nur indirekt, die Vorergebnisse aus den Invasionsassays, Immunoblots und Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt, d.h. das in den Makrophagen durch Ko-Kultur hochregulierte Wnt-5a bedingt keine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in den Tumorzellen.

Weiterhin wird auch die Antagonisierung des Ko-Kultur- bzw. des Wnt-5a-Effektes durch Dkk1 nicht über eine etwaige Inhibierung des kanonischen Signalweges vermittelt.

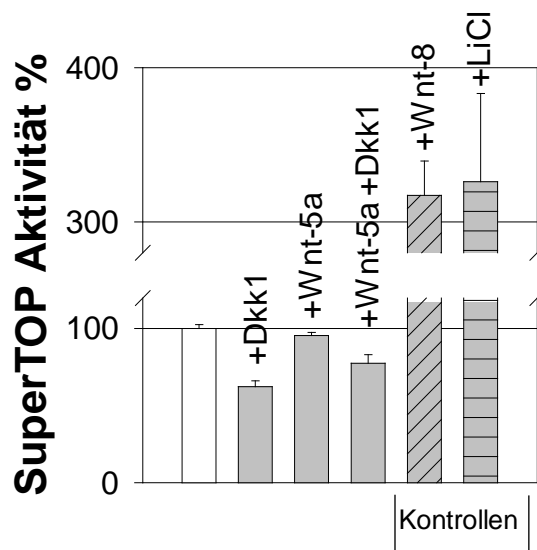


Abbildung 3.15: SuperTOP-Reporterassay von MCF-7-Zellen (weiße Säule), unter Dkk1 (50 ng/ml), Wnt-5a (100 ng/ml) oder Wnt-5a + Dkk1 (graue Säulen), Positivkontrollen unter Wnt-8 oder LiCl (3mM) (schraffierte Säulen), (Mittelwerte, \pm Standardabweichung, n = 3-12)

3.7 Zymographie

Vorversuche der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die durch Makrophagen induzierte Zunahme der Invasivität von MCF-7-Zellen durch eine Steigerung sowohl der intrazellulären als auch der sezernierten MMP-Menge vermittelt wird (Hagemann et al. 2004). Insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, sowie die Caseinasen MMP-3 und MMP-7 werden unter Ko-Kulturbedingungen in den Makrophagen hochreguliert (Hagemann et al. 2004). Unter dem Blickwinkel, ob dieser Effekt eventuell Wnt-abhängig ist, wurden Überstände von Ko-Kulturen in Anwesenheit von rekombinanten Dkk1 und Wnt-5a durch Zymographien untersucht.

3.7.1 MMP-2 und MMP-9 werden durch Dkk1 nicht reguliert

Ausgehend von der dargestellten Invasionsreduktion der ko-kultivierten MCF-7-Zellen durch Dkk1 in den Boyden-Kammer Versuchen, wurde durch Gelatingel-Zymographie untersucht, ob dieser Effekt durch eine Abnahme der sezernierten MMP-9 und MMP-2 vermittelt wird. Aus Ko-Kulturen wurden Überstände abgenommen und durch Zymographie die absolute Menge der sich in Lösung befindenden MMPs bestimmt. Dieser Kontrollgruppe wurde die zymographisch bestimmte MMP-2- und MMP-9-Menge nach Zugabe von 50 ng/ml Dkk1 gggenübergestellt.

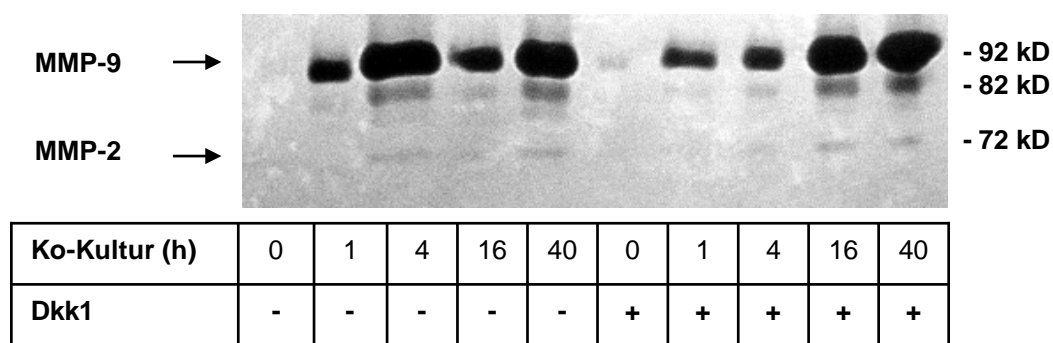


Abbildung 3.16: Gelatinel-Zymographie zum Nachweis von MMP-2 und MMP-9, Überstände aus Ko-Kultur von MCF-7 und Makrophagen, Inkubation unter Dkk1 50 ng/ml (+), Probenentnahme zu den angegebenen Zeitpunkten

Der vorbeschriebene Anstieg der MMP-2- und MMP-9-Konzentration im Überstand der Ko-Kulturen konnte bestätigt werden. Der Wnt-Antagonist Dkk1 bedingte in der invasionshemmenden Konzentration keine Abnahme der proinvasiven MMPs. Die antiinvasive Wirkung von Dkk1 wird somit nicht über einer Herabregulation von MMP-2 oder MMP-9 vermittelt.

3.7.2 MMP-7 wird durch Dkk1 reguliert

Die Auswirkungen von Dkk1 auf die MMP-3 und MMP-7 Proteinexpression der Makrophagen in Ko-Kultur wurden mittels Caseingelzymbographie untersucht. Makrophagenproteinextrakte und Mediumüberstände aus MCF-7- und Makrophagen-Ko-kulturversuchen wurden der Zymbographie unterzogen. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass eine signifikante MMP-3- und MMP-7-Expression in den MCF-7-Zellen nicht stattfindet (Hagemann et al. 2004).

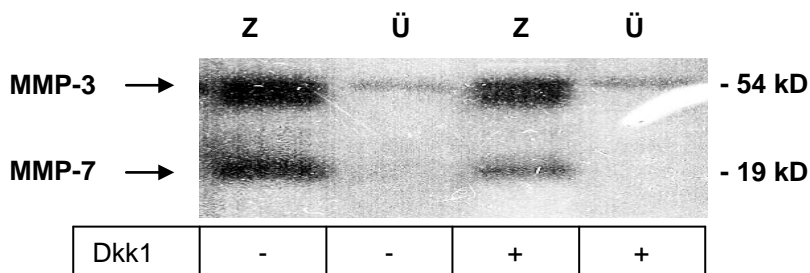


Abbildung 3.17: Caseingelzymbographie aus Zellextrakten (Z) von Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7 und den entsprechenden Überständen (Ü), Zugabe von Dkk1 50 ng/ml (+)

Während die Caseinase MMP-3 durch Dkk1 in den Ko-Kulturversuchen nicht reguliert wird, wird die Menge an intrazellulärer MMP-7 der Makrophagen supprimiert. Ob dies einer gleichsinnigen Reduktion der sezernierten MMP-7 Menge entspricht, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

4 Diskussion

Die Rolle der Makrophagen in der Tumorgenese und –progression ist ambivalent. Als Teil des innaten Immunsystems ist ihnen eine physiologische tumorizide Kapazität eigen. Nach Rekrutierung in einen Tumorgewebeverband erfolgt jedoch regelhaft eine pathologische Polarisierung der Makrophagen in Richtung eines tumorfördernden Phänotyps. Dieser Phänotyp-Shift unterliegt einem komplexen bidirektionalen Regelwerk (Vgl. 1.5).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der Wnt-Signalweg an dieser pathologischen Interaktion zwischen Tumorzellen und TAMs beteiligt ist.

4.1 Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität durch den Wnt-Inhibitor Dkk1

Die Zugabe von rekombinantem, humanem Dkk1 zu einer Ko-Kultur der niedrig-invasiven Zelllinie MCF-7 mit humanen Makrophagen bewirkt eine signifikante Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität der Tumorzellen im in-vitro-Invasionsassay. Diese Reduktion ist direkt proportional zur eingesetzten Dkk1-Konzentration und erreicht ab einer Konzentration von 50 ng/ml ihr Maximum. Unter dieser Dkk1-Konzentration ist die Invasionsrate der Tumorzellen vergleichbar zu der der Kontrolle. Somit ist in vitro eine komplette Aufhebung der Makrophagen-induzierten Invasionssteigerung durch den physiologischen Wnt-Inhibitor Dkk1 erreichbar (Vgl. 3.2.1). Anhand der durchgeführten MTT-Assays konnte ausgeschlossen werden, dass diese Wirkung durch eine Beeinflussung der metabolischen Aktivität der beteiligten Zellpopulationen verursacht wird (Vgl. 3.3.1).

Diese Beobachtungen lassen eine zentrale Rolle des Wnt-Signalweges in der Makrophagen-induzierten Invasivität vermuten. In anderen Tumorentitäten konnte bereits eine Herabregulation des Dkk1-Genproduktes als ursächlich für die Tumorigenese bzw. maligne Transformation benignen Zellen gezeigt werden (Aguilera et al. 2006; Hoang et al. 2004; Mikheev et al. 2004; Sato et al. 2007). Zudem ist das dem Dkk1 homologe Dkk3 für die Motilität und Invasion von mesenchymalen Osteosarkomzellen essentiell (Hoang et al. 2004).

Von besonderer Bedeutung ist zudem die Beobachtung, dass die ektope Expression von Dkk1 in humanen Mammakarzinom-Zelllinien, zu einem verminderten substratunabhängigen Wachstum in vitro und verminderter Tumorigenität in vivo führt (Mikheev et al. 2008).

Aus den publizierten Daten lässt sich daher eine tumorsuppressive und invasionshemmende Wirkung von Dkk1 postulieren. Dies steht im Einklang mit der im Rahmen dieser Arbeit demonstrierten Hemmung der Makrophagen-induzierten Invasion von Brustkrebszellen.

4.2 Fehlende Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch Ko-Kulturbedingungen

Aus dem physiologischen Kontext des Wnt-Signalweges heraus, ist durch Dkk1 eine Beeinflussung des kanonischen Signalweges zu erwarten. Daraus resultierte die Annahme, dass durch die Ko-Kultur eine Aktivierung des kanonischen Signalweges in den Tumorzellen initiiert wird.

Die hierzu durchgeführten Immunoblots ergaben jedoch überraschenderweise ein anderes Bild. Unter Ko-Kulturbedingungen kam es in den Tumorzellen zu keiner Zunahme des signalaktiven, unphosphorylierten β -Catenins über das basale Niveau hinaus (Vgl. 3.4.1). Eine geringe, jedoch reproduzierbar detektierbare Grundmenge an aktiviertem β -Catenin ließ sich unter allen experimentellen Bedingungen nachweisen. Eine Reduktion dieser Grundaktivität konnte durch exogen hinzugeführtes Dkk1 nicht erreicht werden. Der invasionshemmende Effekt von Dkk1 ist somit unabhängig von β -Catenin. Andere Arbeitsgruppen konnten den gleichen Mechanismus im malignen Mesotheliom beobachten (Lee AY et al. 2004).

Weiterhin konnte keine Veränderung der Gesamtmenge an β -Catenin beobachtet werden. Auch die Menge an E-Cadherin, ein wichtiger Modulator des verfügbaren β -Catenin (Nelson und Nusse 2004), wird durch die Ko-Kultur nicht beeinflusst. Folglich findet weder eine Zunahme des bereitgestellten β -Catenin, noch ein Anstieg des Quotienten aus aktivem und inaktivem β -Catenin, welcher in einer relativen Zunahme des für die Signaltransduktion verfügbaren β -Catenin mündet, statt.

Ergänzend durchgeführte Immunfluoreszenzfärbungen gegen β -Catenin bestätigten diese Beobachtungen (Vgl. 3.5.1). Eine nukleäre Translokation von β -Catenin in den Tumorzellen durch die Ko-Kultur wurde auch mit dieser Methode nicht beobachtet.

Zusammenfassend ergibt sich aus den geschilderten Ergebnissen kein Anhalt für eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in MCF-7 durch die Ko-Kultur mit Makrophagen.

Trotz des fehlenden Nachweises einer Aktivierung des β -Catenin-Signaling durch die Ko-Kultur führte jedoch die Hemmung des kanonischen Pfades zur fast vollständigen Aufhebung des Ko-Kultur-Effektes. In-vitro-Invasionsversuche zeigten, dass die Makrophagen-induzierte Invasivität von transient mit den dominant negativen LEF-1- Δ HMG- bzw. LEF-1- Δ β -Cat-Konstrukten transfizierten Tumorzellen erheblich reduziert war (Vgl. 3.2.3). Somit ist eine intakte Aktivität des kanonischen Signalweges in den Tumorzellen eine notwendige, jedoch nicht ausreichende Voraussetzung für die Makrophagen-induzierte Invasivität. Berücksichtigt man vielmehr, dass durch TAMs eine Induktion der Invasion von Karzinomzellen erfolgt (Hagemann et al. 2004), und dass in vitro funktionelles LEF-1 für die Invasion von Brustkrebszellen benötigt wird (Nguyen et al. 2005), so lässt sich durch die geschilderten eigenen Untersuchungen eine überwiegend permissive Funktion des β -Catenins ableiten.

Diese Schlussfolgerung steht in gewissem Widerspruch zu Ergebnissen von überwiegend klinischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, welche durch

immunohistochemische Färbungen eine Aktivierung des klassischen Signalweges insbesondere in lobulären Mamma-Karzinomen zeigen konnten (Karayiannakis et al. 2001). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen nukleärer β -Catenin-Lokalisation und schlechter Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens beschrieben (Lin et al. 2000). Diese Untersuchungen fokussieren jedoch auf andere Tumorentitäten bzw. betrachten nicht die Stromale Komponente, so dass die Resultate allenfalls partiell übertragbar sind.

4.3 Wnt-5a als Mediator der Makrophagen-induzierten Invasivität

Unter den mittels qualitativer RT-PCR analysierten Expressionsniveaus von Komponenten und Zielgenen des Wnt-Signalweges in den MCF-7 und Makrophagen, zeigte alleine Wnt-5a eine signifikante Zunahme unter Ko-Kulturbedingungen (Vgl. 3.1.1). Diese Regulation war zudem auf die Makrophagen beschränkt.

Bei kritischer Analyse der Ergebnisse fällt auf, dass diese Hochregulation von Wnt-5a nur mittels RT-PCR gezeigt werden konnte, während durch die cDNA-Arrays dieser Nachweis nicht gelang. Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in einer niedrigeren Sensitivität des Arrays gegenüber der RT-PCR. Die Ergebnisse der Arrays stellen daher eine Ergänzung, jedoch keine Validierung der PCR-Resultate dar.

Zusammenfassend konnte aber sowohl in den Makrophagen als auch in den Tumorzellen eine konstitutive mRNA-Expression verschiedener kanonischer und nicht-kanonischer Wnts, ihrer Rezeptoren und Zielgene gezeigt werden (Vgl. 3.1.2). Somit ist in beiden Zelltypen von einem Wnt-rezeptiven Phänotyp auszugehen. Die Hochregulation von Wnt-5a durch die Ko-Kultur trifft somit auf einen „fruchtbaren Boden“.

Zur Überprüfung der differentiellen Wnt-5a-Expression war ursprünglich die Durchführung eines Immunoblots angedacht. Trotz wiederholter methodischer Optimierungen ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, diese Methode zu etablieren. Auch der aktuellen Literatur sind, trotz der Anwendung verschiedener Wnt-5a-Antikörper, nur vereinzelt erfolgreiche Immunoblots zu entnehmen. Daher erfolgte zur Beweisführung der Rückgriff auf eine zytologische Immunfluoreszenzfärbung gegen Wnt-5a. In dieser konnte auch auf Proteinebene die Zunahme von Wnt-5a in den Makrophagen durch Ko-Kultur mit MCF-7 bestätigt werden (Vgl. 3.5.2). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der von Smith und Mitarbeitern beobachteten Expression von Wnt-5a in Kolon-Karzinom-Proben (Smith K et al. 1999).

Der Frage, ob diese Regulation eine funktionelle Relevanz besitzt, wurde mittels in vitro-Invasionsversuchen nachgegangen. Hier zeigte die alleinige Zugabe von rekombinantem Wnt-5a eine Steigerung der Invasivität der Tumorzellen. Diese ist dosisabhängig und erreicht unter einer Konzentration von 100 ng/ml ein der Ko-Kultur vergleichbares Niveau. Analog zu den Ko-Kulturversuchen war dieser Wnt-5a-

induzierte Effekt durch die Addition von rekombinanten Dkk1 reversibel (Vgl. 3.2.2). Somit ist durch Wnt-5a eine komplette Mimikry des Ko-Kultur-Effektes erreichbar.

Ein weiterer Hinweis auf eine funktionelle Relevanz von Wnt-5a in der Ko-Kultur ergibt sich aus der Beobachtung, dass Beteiligung die Zugabe von sFRP1 keine signifikante Reduktion der Invasion bewirkt (Pukrop et al. 2006). Interessanterweise zeigen Arbeiten anderer Gruppen eine fehlende Affinität dieses Wnt-Inhibitors insbesondere gegenüber Wnt-5a (Dennis et al. 1999).

In der Zusammenschau der vorliegenden Befunde lässt sich daher über die rein deskriptive Beobachtung der Ko-Kultur-vermittelten Hochregulation von Wnt-5a in den TAMs auf eine funktionelle Bedeutung des sezernierten Proteins in den Tumorzellen schließen.

Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen stützen diese Hypothese. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Wnt-5a in malignen Melanomzellen einen promigratorischen Phänotyp und eine Zunahme der Invasivität erzeugt (Weeraratna et al. 2002). Ein gleichsinniger Effekt lässt sich auch in Pankreas-Karzinom- (Ripka et al. 2007), Nicht-kleinzelligen-Lungen-Karzinom- (Huang et al. 2005) und Magen-Karzinomzellen (Kurayoshi et al. 2006) beobachten. In allen Studien konnte zudem der Nachweis einer Wnt-5a-Expression *in vivo* geführt werden.

Allerdings gibt es auch konträre Untersuchungen. Der immunhistochemische Nachweis des Wnt-5a-Expressionsverlustes in Mammakarzinomen höheren Gradings (Dejmek et al. 2005; Jonsson et al. 2002) führte zur Annahme einer Tumor-Suppressor-Funktion von Wnt-5a. Inwiefern diese deskriptiven Studien auf einer aberranten Aktivierung des kanonischen Signalweges in den Tumorzellen und somit auf einer möglichen Wnt-5a vermittelten Suppression dieses Signalweges beruhen, wurde nicht durch weitere funktionelle Untersuchungen geklärt. Außerdem wurde in diesen Studien nicht auf eine eventuelle Produktion von Wnt-5a durch die TAM mit parakrinem Effekt auf die Tumorzellen fokussiert, wie sie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Die biologische Bedeutung der Wnt-5a-Produktion durch Makrophagen konnte zwischenzeitlich in einem biologisch verwandten Kontext, der chronischen Inflammation mykobakterieller Genese, bestätigt werden. In den Granulomen konnte ebenfalls eine vermehrte Wnt-5a-Produktion durch aktivierte Makrophagen gezeigt werden (Blumenthal et al. 2006).

Wnt-5a agiert in der Embryonalentwicklung als Morphogen, d.h. es steuert Zell- und Gewebebewegungen durch räumlich exakt definierte Expressionsmuster. Es ist daher anzunehmen, dass lokal begrenzte Konzentrationsgradienten eine erhebliche Rolle bei der gerichteten Wanderung und Invasion von Tumorzellen spielen. Dies wurde durch die immunhistochemische Auswertung von insgesamt 32 Tumorschnitten (Pukrop et al. 2006) bestätigt. Es zeigte sich eine variable Expression von Wnt-5a in den TAMs, die jedoch in Makrophagen an der Tumordinvasionsfront am stärksten ausgeprägt war.

Offenbar kann die Funktion von Wnt-5a als Tumor-Suppressor oder –Promotor durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen moduliert werden.

4.4 Analyse weiterer involvierter Wnt-Signalwege

Da zwischen den einzelnen Wnt-Signalwegen sowohl synergistische als auch antagonistische Interaktionen bekannt sind (Vgl. 1.3), wurde die spezifische Wirkung von Wnt-5a auf die verschiedenen Signalkaskaden in dem untersuchten System analysiert.

Neben der bereits gezeigten ausbleibenden Aktivierung des klassischen Signalweges durch die Ko-Kultur konnte auch im SuperTOP-Reporterassay keine Aktivierung der kanonischen Signalkaskade durch Wnt-5a gezeigt werden (Vgl. 3.6.1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Klassifikation von Wnt-5a als nichtkanonisches Wnt (Slusarski et al. 1997b; Wong et al. 1994), welchem überwiegend eine Wirkung außerhalb des kanonischen Signalweges eigen ist. Weiterhin konnte zudem mittels des Reporterassays eine mögliche Repression (Topol et al. 2003) dieses Signalweges durch Wnt-5a ausgeschlossen werden.

Ein signifikanter Einfluss von Dkk1 auf den Wnt-5a-Effekt durch eine Antagonisierung des kanonischen Signalweges ergab sich im Reporterassay ebenfalls nicht. Damit konnte die bereits im Immunoblot und in der Immunfluoreszenzfärbung beobachtete fehlende Wirkung von Dkk1 auf β -Catenin bestätigt werden.

Andere Arbeiten zeigten im malignen Melanom eine durch Wnt-5a vermittelte Stimulation der PKC, d.h. des Wnt/ Ca^{2+} -Signalweges (Dissanayake et al. 2007; Weeraratna et al. 2002). Daraus resultierte *in vitro* eine Invasionssteigerung. In der untersuchten Ko-Kultur von MCF-7 und Makrophagen konnte mittels Immunoblot jedoch keine Aktivierung der PKC in den Tumorzellen detektiert werden. Die Makrophagen-induzierte Invasionssteigerung wird somit in den Tumorzellen nicht durch den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg vermittelt.

Ergänzend zu den Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine eventuelle Aktivierung von c-jun/AP1 im Rahmen des PCP-Signalweges überprüft. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe und anderer Autoren (Hagemann et al. 2005; Weber et al. 2000) konnte sowohl durch die Ko-Kultur als auch durch Wnt-5a eine Zunahme der AP1-Promotor-Aktivität beobachtet werden (Pukrop et al. 2006). Die Zugabe von Dkk1 führte zu einer Inhibition dieses Effekts. Die Wnt-5a-induzierte Steigerung der Invasivität von Tumorzellen in Ko-Kultur mit Makrophagen wird somit über den c-jun/AP1- bzw. über den nichtkanonischen PCP-Signalweg vermittelt. Weitere Mitglieder dieses Signalkomplexes wie RhoA und Rac stellen eine wesentliche Quervernetzung zur Zytoskelettorganisation und damit zur Zellmigration und -invasion her.

Wie bereits geschildert besteht für die Tumorzellinvasion die Notwendigkeit eines funktionell intakten, jedoch durch Ko-Kultur nicht zwangsläufig aktivierten β -Catenin-Signalweges. Zusammen mit den obigen Ergebnissen lässt sich somit postulieren, dass

für die Makrophagen-induzierte Invasion sowohl eine kanonische als auch eine nichtkanonische Wnt-Signalkompetenz unerlässlich sind.

4.5 Wnt-abhängige Regulation pro-invasiver Faktoren

Die durch Makrophagen-induzierte Invasionssteigerung von niedrig invasiven Tumorzellen beruht auf einer TNF- α -abhängigen Zunahme der MMP-Produktion der Makrophagen (Hagemann et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die invasionshemmende Wirkung von Dkk1 nicht auf einer Reduktion der MMP-2-, MMP-3- oder MMP-9-Produktion beruht. Es kommt jedoch unter Dkk1 zu einer signifikanten Abnahme der MMP-7-Synthese in den Makrophagen.

Die Caseinase MMP-7 stellt einerseits ein Zielgen des klassischen Wnt-Signalweges dar (Crawford et al. 1999), wird aber auch durch die alternativen Wnt-Signalkaskade reguliert (Le Floch et al. 2005). Durch Zugabe eines JNK-Inhibitors ist eine Hemmung der MMP-7 Produktion zu beobachten (Pukrop et al. 2006). Somit ist anzunehmen, dass im vorliegenden Fall MMP-7 in den Makrophagen über den PCP-Signalweg reguliert wird.

MMP-7 ist als *shedding protease* für TNF- α bekannt (Gearing et al. 1994; Ii et al. 2006). Wie von der Arbeitsgruppe bereits beschrieben, ist TNF- α ein wichtiger Mittler der Tumorzell-Makrophagen-Interaktion und der nachfolgenden Induktion von MMPs (Hagemann et al. 2004). Dies wird dadurch bestätigt, dass die im Makrophagen-Kulturüberstand detektierbare TNF- α -Menge durch Wnt-5a reguliert wird. In der Ko-Kultur wiederum führt Dkk1 zu einer teilweisen Abnahme von TNF- α (Pukrop et al. 2006).

Daraus lässt sich folgendes Modell ableiten: die Ko-Kultur mit Tumorzellen bedingt eine Hochregulation von Wnt-5a in Makrophagen, woraus eine vermehrte Produktion von MMP-7 resultiert. Diese wiederum ist ursächlich für eine gesteigerte TNF- α -Freisetzung und Aktivierung weiterer MMPs, die für die Invasion entscheidend sind. Dies stellt eine Schnittstelle zwischen dem Wnt-Signalweg und der für die Invasion notwendigen proteolytischen Aktivität dar. Somit gibt es Hinweise darauf, dass Wnt-5a nicht nur über den PCP-Pfad die vermehrte Zellinvasion steuert, sondern auch der für den ganzen Prozess unerlässlichen Aktivierung von TNF- α und MMPs übergeordnet ist. Offenbar ist Wnt-5a im vorliegenden Modell ein zentraler Regulator der Makrophagen-induzierten Invasion. Anhand der in Mamma-Karzinom-Biopsaten beobachteten Wnt-5a-Expression in TAMs an der Tumordinvasionsfront lässt sich eine analoge Bedeutung *in vivo* ableiten.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit somit für eine Funktion von Wnt-5a als Promotor der Invasion und Tumorzell dissemination, wobei die Abläufe im Einzelnen teilweise noch ungeklärt sind. Da der Wnt 5a-Effekt stark vom zellulären Kontext und der umgebenden ECM beeinflusst ist, sollten diese in weitere Untersuchungen detailliert mit einbezogen werden. Insbesondere ist eine weitere Analyse der Wnt-vermittelten Signalkaskaden in den TAMs notwendig.

5 Zusammenfassung

Die Interaktion zwischen malignen Tumorzellen und den umgebenden benignen Stromazellen stellt einen bedeutenden supportiven Aspekt der Tumorbilogie dar. So erwerben im Mamma-Karzinom die Tumor-assoziierten Makrophagen einen pro-invasiven Phänotyp, welcher durch eine invasionsfördernde Zytokin- und MMP-Produktion charakterisiert ist.

Aufgrund der Beteiligung an embryonalen Zelldifferenzierungs- und -migrationsvorgängen ist die Familie der Wnt-Signalproteine ein weiterer potentieller Mittler in dieser Kommunikation. Ziel dieser Arbeit war daher, die Beteiligung von Wnt-Proteinen in der Makrophagen-vermittelten Tumordinvasionssteigerung zu untersuchen.

Anhand des erarbeiteten Expressionsmusters von Wnt-Rezeptoren, -Liganden und -Zielgenen konnte zunächst ein Wnt-sensitiver Phänotyp in den Tumorzellen und Makrophagen identifiziert werden. Darüber hinaus gelang es zu zeigen, dass die Ko-Kultur von MCF-7-Zellen mit Makrophagen in diesen zu einer vermehrten Wnt-5a-cDNA-Synthese und -Proteinexpression führt.

Durch den Einsatz von rekombinanten Wnt-5a konnte in in-vitro-Invasionsversuchen dann auch die durch Ko-Kultur-bedingte Invasionssteigerung nachgeahmt werden. Durch den physiologischen Wnt-Antagonist Dkk1 ist in diesem System eine Inhibition sowohl der Makrophagen-abhängigen Ko-Kultur-Effekts als auch der Wnt-5a-bedingten Invasivität der Tumorzellen erreichbar.

Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass ein intakter kanonischer, d.h. β -Catenin-abhängiger, Wnt-Signalweg in den Tumorzellen für deren Invasionssteigerung eine notwendige Voraussetzung ist. Es erfolgt jedoch keine nachweisbare Aktivierung der kanonischen oder der alternativen PKC-Signalkaskade in den malignen Zellen. Weiterführende Studien offenbarten die JNK sowie den c-jun/AP1-Komplex und damit den promigratorischen PCP-Signalweg als für die Invasionssteigerung kritischen Wnt-5a-Effektor in MCF-7-Zellen. Ergänzend konnte in den Makrophagen MMP-7 als ein wichtiger Wnt-abhängiger Faktor identifiziert werden.

Aufgrund der erhobenen Daten stellt Wnt-5a im untersuchten Modell der Interaktion zwischen Makrophagen und Brustkrebszellen einen zentralen Regulator der Makrophagen-induzierten Invasion dar. Dies betrifft sowohl die autokrine proteolytische Aktivität der Makrophagen als auch die parakrine Invasionssteigerung der Tumorzellen. Der später erfolgte Nachweis der Wnt-5a-Expression in Makrophagen in Mamma-Karzinom-Biopsaten verweist zudem auf eine analoge Bedeutung der geschilderten Effekte in vivo.

6 Literaturverzeichnis

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797 - 3804

Aguilera O, Paz MF, Herranez M, Fraga MF, Ballestar E, Espada J (2006): Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116 - 4121

Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY (2002): Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 298, 2006 - 2010

Bacchetti S, Graham FL (1977): Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 1590 - 1594

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539 - 545

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638 - 642

Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P et al. (1990): Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50, 4087 - 4091

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225 - 230

Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N (2006): The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965 - 973

Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453 - 466

Boyum A (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77 - 89

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999): beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033 - 1038

Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225 - 2230

Brennan KR, Brown AM (2004): Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 119 - 131

Candidus S, Bischoff P, Becker KF, Hofler H (1996): No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res* 56, 49 - 52

Chinnadurai G (2002): CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell* 9, 213 - 224

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry (Mosc)* 18, 5294 - 5299

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156 - 159

Clevers H (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469 - 480

Condeelis J, Pollard JW (2006): Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263 - 266

Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM (1999): The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18, 2883 - 2891

Dale TC, Weber-Hall SJ, Smith K, Huguet EL, Jayatilake H, Gusterson BA, Shuttleworth G, O'Hare M, Harris AL (1996): Compartment switching of WNT-2 expression in human breast tumors. *Cancer Res* 56, 4320 - 4323

Daniels DL, Weis WI (2005): Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 364 - 371

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2005): Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867 - 872

Dejmek J, Leandersson K, Bjartell A, Emdin SO, Vogel WF, Landberg G, Andersson T (2005): Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays a distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 11, 520 - 528

Dennis S, Aikawa M, Szeto W, d'Amore PA, Papkoff J (1999): A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci* 112 (Pt 21), 3815 - 3820

Dissanayake SK, Wade MS, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD (2007): The Wnt5a/PKC pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors, and the initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 17259 - 17271

Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT (1995): Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15, 2625 - 2634

Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650 - 1659

Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G (1990): Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65, 2121 - 2128

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL et al. (1994): Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555 - 557

Glukhova M, Kotliansky V, Sastre X, Thiery JP (1995): Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 146, 706 - 716

Habas R, Dawid IB, He X (2003): Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17, 295 - 309

Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543 - 1549

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster D, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill F (2005): Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NFk-B and JNK. *J Immunol* 175, 1197 - 1205

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557 - 580

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57 - 70

Hart MJ, de los SR, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (1998): Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8, 573 - 581

Hauptmann S, Schnalke T (2001): Rudolf Virchows Sicht der malignen Geschwülste. *Pathologe* 22, 291 - 295

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509 - 1512

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663 - 1677

Heussen C, Dowdle EB (1980): Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102, 196 - 202

Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb A, Mazza B.A., Meyers PA, Gorlick R (2004): Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt- β -catenin pathway. *Cancer Res* 64, 2734 - 2739

Holland LZ, Rached LA, Tamme R, Holland ND, Kortschak D, Inoko H, Shiina T, Burgdorf C, Lardelli M (2001): Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (AmphiNotch): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates. *Dev Biol* 232, 493 - 507

Hoppler S, Kavanagh CL (2007): Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 120, 385 - 393

Huang C, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005): Wnt5a Expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor - an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23, 8765 - 8773

Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996): Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3 - 10

Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y (2006): Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 20 - 27

- Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T (2002): Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 62, 409 - 416
- Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Davaris PS, Pignatelli M (2001): Expression patterns of beta-catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 27, 31 - 36
- Katoh M (2001): Differential regulation of WNT2 and WNT2B expression in human cancer. *Int J Mol Med* 8, 657 - 660
- Kawano Y, Kypta R (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627 - 2634
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1994): Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218, 325 - 329
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997): Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784 - 1787
- Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT (2000a): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701 - 12711
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000b): The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279 - 283
- Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A (2006): Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 66, 10439 - 10448
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685

Le Floch N, Rivat C, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Dale T, Gespach C (2005): The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3beta and c-Jun/AP-1 signaling. *FASEB J* 19, 144 - 146

Lee AY, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, Jablons DM (2004): Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of β -catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1246 - 1250

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56, 4625 - 4629

Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL (2000): Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190, 430 - 436

Lewis CE, Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605 - 612

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW (2001): Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727 - 740

Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M, Jr., Luyten FP (1997): The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11196 - 11200

Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC (2000): Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4262 - 4266

Ma L, Wang HY (2006): Suppression of cyclic GMP-dependent protein kinase is essential to the Wnt/cGMP/Ca²⁺ pathway. *J Biol Chem* 281, 30990 - 31001

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ et al. (1999): Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603 - 1608

- Mantovani A (1989): Tumor-associated macrophages. *Curr Opin Immunol* 2, 689 - 692
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992): The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13, 265 - 270
- Mantovani A, Allavena P, Sica A (2004a): Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 40, 1660 - 1667
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004b): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677 - 686
- Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001): LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321 - 325
- Mikels AJ, Nusse R (2006a): Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25, 7461 - 7468
- Mikels AJ, Nusse R (2006b): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, 570 - 582
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H (2004): A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* 25, 47 - 59
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Maxwell JP, Rivo JV, Rostomily R, Swisshelm K, Zarbl H (2008): Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 112, 263 - 273
- Mirkovic I, Mlodzik M (2006): Cooperative activities of drosophila DE-cadherin and DN-cadherin regulate the cell motility process of ommatidial rotation. *Development* 133, 3283 - 3293

Molenaar M, van de WM, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996): XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391 - 399

Moon RT, DeMarais A, Olson DJ (1993): Responses to Wnt signals in vertebrate embryos may involve changes in cell adhesion and cell movement. *J Cell Sci Suppl* 17, 183 - 188

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004): WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691 - 701

Moriguchi T, Kawachi K, Kamakura S, Masuyama N, Yamanaka H, Matsumoto K, Kikuchi A, Nishida E (1999): Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J Biol Chem* 274, 30957 - 30962

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55 - 63

Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A (2005): Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* 437, 281 - 285

Nelson WJ, Nusse R (2004): Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483 - 1487

Nguyen A, Rosner A, Milovanovic T, Hope C, Planutis K, Saha B, Chaiwun B, Lin F, Imam SA, Marsh JL et al. (2005): Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression. *Int J Oncol* 27, 949 - 956

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P (1991): Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665 - 669

Noel A, Jost M, Maquoi E (2008): Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 19, 52 - 60

- Nusse R (2005): Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28 - 32
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795 - 801
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC et al. (2003): The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8, 645 - 654
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000): An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535 - 538
- Polakis P (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837 - 1851
- Price MA (2006): CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev* 20, 399 - 410
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C (2006): Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5454 - 5459
- Pukrop T, Binder C (2008): The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 86, 259 - 266
- Pupa SM, Bufalino R, Invernizzi AM, Andreola S, Rilke F, Lombardi L, Colnaghi MI, Menard S (1996): Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2-overexpressing breast carcinomas. *J Clin Oncol* 14, 85 - 94
- Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, Dai X, Chen P (2007): Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 306, 121 - 133
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987): The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649 - 657

Ripka S, König A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Klöppel G, Downward J, Gress TM, Michl P (2007): WNT5A - target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 6, 1178 - 1187

Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de WM, Destree O, Clevers H (1998): The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608 - 612

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487 - 491

Sambrook J, Fritsch EF, und Maniatis T: *Molecular Cloning.*; in: *A laboratory manual*. 2. Auflage Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989,

Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Marayuma R, Sasaki S, Tagaki H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M et al. (2007): Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28, 2359 - 2466

Sauer R, Schauer A, Rauschecker HF, Schumacher M, Gatzemeier W, Schmoor C, Dunst J, Seegenschmiedt MH, Marx D (1992): Therapy of small breast cancer: a prospective study on 1036 patients with special emphasis on prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23, 907 - 914

Schambony A, Wedlich D (2007): Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* 12, 779 - 792

Schauer A, Marx D, Lipp I, Schumacher M, Sauerbrei W, und Sauer R: Diagnostic tools and prognostic factors in human breast cancer evaluated by morphological and immunohistological methods; in: *Breast cancer: Biological and clinical progress* hrsg. v. Dogliotti VL, Sapino A, Bussolati G; Kluwer Academic Publishers, Boston 1991, 255-276

Seifert JR, Mlodzik M (2007): Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8, 126 - 138

Sen M, Lauterbach K, El Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA (2000): Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2791 - 2796

Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT (1999): Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9, 695 - 698

Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT (2003): Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 161, 769 - 777

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben Ze'ev A (1999): The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522 - 5527

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006): Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 717 - 727

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707 - 712

Slusarski DC, Corces VG, Moon RT (1997a): Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410 - 413

Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT (1997b): Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182, 114 - 120

Slusarski DC, Pelegri F (2007): Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol* 307, 1 - 13

Smalley MJ, Dale TC (2001): Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 37 - 52

Smith K, Bui TD, Poulson R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL (1999): Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 81, 496 - 502

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76 - 85

Sorlie T, Bukholm I, Borresen-Dale AL (1998): Truncating somatic mutation in exon 15 of the APC gene is a rare event in human breast carcinomas. *Mutations in brief no. 179*. Online. *Hum Mutat* 12, 215 -

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409 - 1416

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990): Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 364 - 368

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR (2006): Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 42, 745 - 750

Takemaru KI, Moon RT (2000): The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149, 249 - 254

Tetsu O, McCormick F (1999): Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422 - 426

Thein SL und Wallace RB: The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders.; in: *Human Genetic Diseases. A practical Approach*. hrsg. v. Davis KE; Herndon 1986, 33-50

Tolwinski NS, Wieschaus E (2004): Rethinking WNT signaling. *Trends Genet* 20, 177 - 181

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003): Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899 - 908

Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S (2005): Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 14, 425 - 431

Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, Germeyer A, Lessey BA, Taylor RN, Suchanek E et al. (2003): Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3860 - 3866

Van de Vijver MJ, Nusse R (1991): The molecular biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1072, 33 - 50

van Kempen LC, Ruiter DJ, van Muijen GN, Coussens LM (2003): The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 82, 539 - 548

van Noort M, Meeldijk J, van der ZR, Destree O, Clevers H (2002): Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 277, 17901 - 17905

Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA (1987): Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1, 423 - 430

Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT (2003): Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 13, 680 - 685

Vogelstein B, Kinzler KW (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138 - 141

Wallingford JB, Habas R (2005): The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421 - 4436

Wang H, Malbon CC (2003): Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* 300, 1529 - 1530

Wang H, Lee Y, Malbon CC (2004): PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem Soc Trans* 32, 792 - 796

Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K (2005): Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* 15, 76 - 83

Weber U, Paricio N, Mlodzik M (2000): Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Development* 127, 3619 - 3629

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM (2002): Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279 - 288

Wehrle-Haller B, Imhof BA (2003): Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 39 - 50

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S (2000): arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527 - 530

Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST (1999): Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154, 515 - 523

Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L (2001): *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81 - 91

Witz IP, Levy-Nissenbaum O (2006): The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett* 242, 1 - 10

Wodarz A, Nusse R (1998): Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59 - 88

Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278 - 6286

Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996): The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10, 1443 - 1454

Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61, 6050 - 6054

Lebenslauf

Am 17. November 1978 wurde ich in Mittweida als Sohn von Ute Ursula Klemm, geb. Müller, und Ronald Klemm geboren.

Nach vier Schuljahren von 1985-1989 an der 10. Polytechnischen Oberschule in Eisenach, besuchte ich ab dem Schuljahr 1990 das Elisabeth-Gymnasium in Eisenach. Vor der gymnasialen Oberstufe war ich von 1995-1996 Austauschschüler an der Waverly-Shell Rock High School in Waverly, IA, USA – der Partnerstadt Eisenachs. Am 09. Juli 1998 schloss ich meine Schulausbildung mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abiturnote 1,1) ab.

Im Anschluss an meinen Wehrersatzdienst als Rettungsdiensthelfer beim Deutschen Roten Kreuz in Eisenach nahm ich im Wintersemester 1999 mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Dieses beendete ich am 12.12.2006 mit dem Abschluss des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote gut). Zuvor absolvierte ich ein Tertial meines Praktischen Jahrs am Royal London Hospital, dem Lehrkrankenhaus der Queen Mary University, London, UK.

Seit dem 01.02.2007 bin ich in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Göttingen als Assistenzarzt beschäftigt.

Meine Promotion realisierte ich in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. C. Binder (Abteilung Hämatologie/Onkologie der UMG). Zudem konnte ich Teile dieser Arbeit als Research Fellow im Translationol Oncology Laboratory, John Vane Science Centre in London in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. F. Balkwill gestalten. Über die Dissertation hinaus bin ich in die Arbeitsgruppe von Frau Prof. C. Binder integriert und beschäftige mich weiterhin mit der Interaktion zwischen Tumorzellen und Makrophagen.